



**VIVIANE ALVES DE OLIVEIRA**

**U**

**F**

**R**

**N**

**IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS APE1, XRCC1,  
p53 e Ki67 EM CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL**

**NATAL/RN**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

**VIVIANE ALVES DE OLIVEIRA**

**IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS APE1, XRCC1, p53 e  
Ki67 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE  
LÍNGUA ORAL**

**NATAL/RN**

**2018**

VIVIANE ALVES DE OLIVEIRA

**IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS APE1, XRCC1, p53 e Ki67 EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Patologia Oral.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Roseana de Almeida Freitas.

NATAL/RN  
2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Alberto Moreira Campos - -Departamento de Odontologia

Oliveira, Viviane Alves de.

Imunoexpressão das proteínas APE1, XRCC1, p53 e Ki67 em carcinoma de células escamosas de língua oral / Viviane Alves de Oliveira. - 2018.

113 f.: il.

Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Patologia Oral, Natal, 2018.

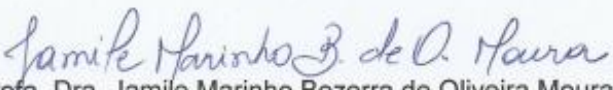
Orientador: Roseana de Almeida Freitas.

1. Neoplasias bucais- Tese. 2. Carcinoma de Células Escamosas - Tese. 3. Reparo do DNA - Tese. 4. Proliferação celular - Tese. 5. Imuno-histoquímica - Tese. I. Freitas, Roseana de Almeida. II. Título.

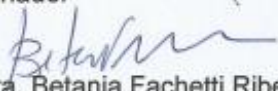
Elaborado por Hadassa Daniele Silva Bulhões - CRB-313/15

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 25 de janeiro de 2018, em Natal/RN, obteve o conceito "aprovado".

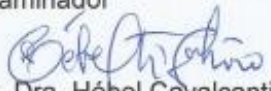
#### COMISSÃO EXAMINADORA

  
Profa. Dra. Jamile Marinho Bezerra de Oliveira Moura  
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

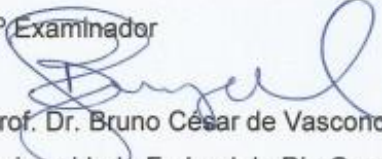
1º Examinador

  
Profa. Dra. Betania Fachetti Ribeiro  
Universidade Potiguar

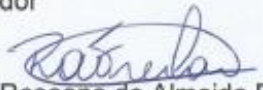
2º Examinador

  
Profa. Dra. Hébel Cavalcanti Galvão  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

3º Examinador

  
Prof. Dr. Bruno César de Vasconcelos Gurgel  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

4º Examinador

  
Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Presidente - Orientadora

---

*Dedicatória*

---

*"Dedico esse trabalho aos meus pais Marlene e Elismar, por estarem sempre ao meu lado, nos momentos bons e nos de aflição, e aos meus irmãos Vagner e Vanessa por serem parte integrante de mim."*

---

# *Agradecimientos*

---



## AGRADECIMENTOS

*A gente espera tanto um final e quando se vê perto do fim passa um filme na cabeça por tudo que passamos, tudo que sentiremos saudades, por todos os momentos vividos, todos os apertados vencidos. Mas, melhor encarar que não é o fim, porque vínculos verdadeiros foram criados e muita coisa levamos e guardamos no melhor lugar do nosso coração. Quatro anos não são quatro dias e quantos altos e baixos. Hora se acredita, ora se pergunta e duvida. e um dia duvidei que poderia chegar nesse momento. Tive ajuda de tanta gente boa, que me falta palavras e me resta agradecer por não terem me deixado desistir. Por serem meu pensamento quando eu não o tinha, por serem o abraço que eu não poderia receber da minha família, e por serem força quando eu achei que não mais existia. O “Vai Vivi, você consegue” fica na minha cabeça até hoje, e se me perguntarem como o tempo passou e eu consegui levar, só vejo uma explicação: Deus, mandando anjos na forma de pessoas para me ajudar a caminhar quando me faltou até mesmo o chão e a capacidade de acreditar. E por eles eu agradeço do fundo do meu coração.*

*Sou grata primeiramente e acima de tudo a Deus. Tive tantas provas de que ele me sustentou. Por vezes achei que estava só e me perguntava o porquê, e tive tantas provas de que em todos os momentos era em minhas mãos que ele segurava, era minhas forças que eram renovadas e quando eu não mais podia se quer andar, era no colo que ele me carregava.*

*Agradeço aos meus pais Marlene e Elismar, que lutaram comigo, oraram quando não podiam estar por perto e por serem exemplo de superação, de amor, de carinho, de renovação de esperança, são literalmente meus heróis e meus amores. Aos meus irmãos Vagner e Vanessa por eu saber sempre que estavam e estão ali, uma parte de mim que eu posso contar. Vanessa, minha irmã linda, minha companheira de profissão, minha confidente, são tantos planejamentos compartilhados e hoje também o compartilhamento de ajuda na vida, muito obrigada. Todos choraram juntos e hoje poder dar essa alegria é para mim um motivo de muito agradecimento.*

*O que dizer da minha turma do doutorado? Cúmplices até o fim. Eu não poderia ter ficado e chegado em outro momento, com outras pessoas, foram essas as certas, as escolhidas*

*por Deus para estarem ali. Me doaram amor, companheirismo, compartilhamento de saber e aquela força que eu só via ali...é para seguir? Vamos todos juntos. E estudamos juntos, lutamos juntos e por um bom tempo era a família que eu tinha. Obrigada Andréia, Luciana, Malu, Tiago, Marcelo, Laudénice e Laura.*

*Não tem como eu deixar de agradecer minhas companheiras de apartamento Melka e Rafaela. Melka, pessoa especial que me alegrava só com seu jeito. Que deixou marcada não só em mim, mas em toda patologia, né “Mestra Melka”. Mesmo de longe tenho um carinho grande, sem contar as ajudas nesse trabalho, tirando as dúvidas do banco de dados, da estatística. Rafa... compartilhou comigo metade do doutorado, obrigada por me ouvir, me aconselhar, por ser amiga irmã sempre que precisei. Nessa loucura de vida corrida que eu levava, as conversinhas eram meus acalantos.*

*Agradeço a minha orientadora Prof<sup>ta</sup>. Dra<sup>a</sup>. Rosena de Almeida Freitas, pela compreensão nos meus momentos de ausência, ou se não fui exatamente do agrado, saiba que foi com todas as forças que eu tinha. Obrigada por me ouvir e por me ajudar a não desistir. Quando eu não via mais por onde caminhar foi você e professora Prof<sup>ta</sup>. Dra<sup>a</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão, a qual agradeço imensamente e tenho muito carinho, em uma conversa e em um abraço, que me deram força para chegar aqui. Só Deus saberá das minhas cobranças internas, das barreiras que tive que ultrapassar e a humanidade e as palavras naquele momento nunca esquecerei. Que Deus consiga retribuir, por enxergarem o verdadeiro significado da palavra “Cultivar o Saber”.*

*Obrigada aos queridos colaboradores da patologia, que todos os dias me recebiam com um lindo bom dia e com um elogio. Cada vez parecia Deus mandando eles dizerem: Seja bem-vinda para mais um dia, que esse dia seja leve, pois estamos aqui com você. Lurdinha, Sandrinha, Ricardo, Hével, Idel. Continuem sempre assim.*

*Não posso mesmo deixar de agradecer a algumas pessoas especiais que entraram na minha vida de mansinho e me ajudaram com tanto carinho, compreensão, companheirismo, amizade verdadeira, sem poréns: Noelma e Maricélia. Obrigada pois vocês me ajudaram a perceber que existe gente com coração aberto para viver com você o que você precisar. Por ser*

*abrigo, me emprestarem família e até colo de vó. Que traziam comida quando até a fome me faltava e mandavam aquele recadinho logo cedo...bom dia! Acorde para mais um dia guerreira, #forçavivi. Como eu agradecia a Deus e agradeço hoje. Meu muito obrigada. Contem comigo sempre.*

*Por falar em amizade, Thâmara me vem logo na mente. Amiga de mestrado que a vida me deu, quanto amor ao próximo. Quanto senso de ajuda. Obrigada por você existir e fazer parte da minha vida. Mesmo de longe, sua ajuda foi essencial, e sua amizade para mim será sempre essencial.*

*Ramon Enoc, eu jamais poderia deixar de citar você nesse momento. Obrigada por me ajudar a me superar. A ser mais eu. Não perfeita, mas simplesmente a melhor versão do que eu poderia ser. Levando o passado como lição, descobrindo o potencial e valorizando cada minuto vivido. Você merece todo sucesso do mundo e no nesse roll o meu nome pode ser incluído, porque mesmo que eu não tivesse nada, mesmo assim, agradeceria por cada momento vivido e acreditaria que o melhor ainda está por vir e teria a incrível proeza de acreditar. Simplesmente agradecer e acreditar.*

*Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Oral: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina da Costa Miguel, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Éricka Janine Dantas da Silveira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Myriam Costa de Medeiros, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lélia Maria Guedes Queiroz, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lélia Batista de Souza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hébel Cavalcanti Galvão, Prof. Dr. Bruno César de Vasconcelos Gurgel, Prof. Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa, Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barbosa.*

*Aos familiares e amigos que estão sempre ao meu lado.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que possibilitou o apoio financeiro para realização dessa pesquisa.*

*A Universidade Federal do Rio Grande Do Norte (UFRN), pela qualidade de seus serviços e por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento profissional e pessoal.*

*“Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

Sendo eu, um aprendiz  
A vida já me ensinou que besta  
É quem vive triste  
Lembrando o que faltou

Magoando a cicatriz  
E esquece de ser feliz  
Por tudo que conquistou

Afinal, nem toda lágrima é dor  
Nem toda graça é sorriso  
Nem toda curva da vida  
Tem uma placa de aviso  
E nem sempre o que você perde  
É de fato um prejuízo

O meu ou o seu caminho  
Não são muito diferentes  
Tem espinho, pedra, buraco  
Pra não atrasar a gente

Mas não desanime por nada  
Pois até uma topada  
Empurra você pra frente

Tantas vezes parece que é o fim  
Mas no fundo, é só um recomeço  
Afinal, pra poder se levantar  
É preciso sofrer algum tropeço

É a vida insistindo em nos cobrar  
Uma conta difícil de pagar  
Quase sempre, por ter um alto preço

Acredite no poder da palavra desistir  
Tire o D, coloque o R  
Que você tem Resistir

Uma pequena mudança  
Às vezes traz esperança  
E faz a gente seguir

Continue sendo forte  
Tenha fé no Criador  
Fé também em você mesmo  
Não tenha medo da dor

Siga em frente a caminhada  
E saiba que a cruz mais pesada  
O filho de Deus carregou

*Bráulio Bessa*

---

*Resumo*

---

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) resulta de processos de descontroles de eventos celulares provocados por mutações decorrentes de agentes genotóxicos, o que pode levar, dentre outros fatores, à perda de controle do processo de proliferação celular, sendo este considerado um dos precursores do câncer oral. A busca por biomarcadores para o CCEO constitui alvo de várias pesquisas, dentre as quais destacam-se proteínas de reparo do DNA como a XRCC1 e APE1 e proteínas do ciclo celular como p53 e Ki67. Assim, o objetivo desta pesquisa foi analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo APE1, XRCC1 e das proteínas envolvidas no ciclo celular p53 e ki67, associando-as entre si e com parâmetros prognósticos clínicos e histopatológicos, em carcinoma de células escamosas de língua oral (CCELO), visando contribuir para o melhor entendimento da participação dessas proteínas no desenvolvimento desta neoplasia. A expressão imunoistoquímica de APE1 e XRCC1 foi avaliada de forma semiquantitativa e a de p53 e ki67 de forma quantitativa, em 58 casos de Carcinoma de células escamosas de língua oral (CCELO). Os dados clínicos foram coletados nos prontuários médico de cada paciente e a gradação histopatológica de Brandwein-Gensler efetuada para cada caso. Para a análise estatística foram realizados os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher e adotou-se significância de  $p < 0,05$ . A maioria dos casos apresentou alta imunoexpressão para APE1 ( $n = 36$ ; 62,1%), assim como para XRCC1 ( $n = 38$ ; 65,5%). Já para as proteínas Ki67 e p53, houve uma distribuição igual quando os casos foram categorizados em baixa e alta expressão ( $n = 29$ , 50%). A imunoexpressão de XRCC1 foi significativamente maior nos casos de lesão em estágio inicial I e II ( $n = 23$ ; 62,2%) em relação aos estágios avançados III e IV ( $n=16$ , 80%,  $p = 0,05$ ). A imunoexpressão de p53 foi significativamente maior nos casos de lesão em estágio avançado ( $n = 19$ ; 65,5%) e baixa em estágios iniciais ( $n=17$ , 60,7%;  $p = 0,047$ ). Nenhuma das proteínas estudadas mostrou associação entre si, nem com os demais parâmetros clínicos e a gradação histopatológica. Apesar da associação significativa da maior imunoexpressão de XRCC1 com melhor estadiamento clínico e da p53 com o pior estadiamento clínico, estas não foram embasadas quando analisado o desfecho dos pacientes. Os resultados desta pesquisa indicam que XRCC1 e APE1 participam do processo de carcinogênese do CCELO, porém, a expressão imunoistoquímica destas e de p53 e Ki67 não mostraram associação com parâmetros prognósticos.

**Palavras-chave:** Câncer Oral. Carcinoma de células escamosas. Reparo do DNA. Proliferação celular. Imunoistoquímica.

---

*Abstract*

---



## ABSTRACT

Oral squamous cells carcinoma (OSCC) results from processes of decontrol of cellular events caused by mutations due genotoxic agents, which may lead, among other factors, to loss of control of the cellular proliferation process, being considered as one of the precursors of oral cancer. Searching biomarkers for OSCC is the target of several studies, among the markers it is highlighted the DNA repair proteins, such as XRCC1 and APE1, and cell cycle proteins, such as p53 and Ki67. Thus, the aim of this study was to analyze the immunohistochemical expression of APE1, XRCC1 and the proteins involved in the cell cycle, p53 and ki67, associating them with clinical and histopathological prognostic parameters in oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC), in order to contribute to the better understanding of the participation of these proteins in the development of this neoplasia. The immunohistochemical expression of APE1 and XRCC1 was evaluated semiquantitatively and the expression of p53 and ki67 quantitatively, in 58 cases of OTSCC. Clinical data were collected from the medical records of each patient and the histopathological grading of Brandwein-Gensler was carried out for each case. For the statistical analysis, Chi-square and Fisher's exact test were performed, and significance was set at  $p < 0.05$ . The majority of cases showed high immunoexpression of APE1 ( $n = 36$ ; 62.1%), as well as of XRCC1 ( $n = 38$ ; 65.5%). In relation to the Ki67 and p53 proteins, there was an equal distribution when the cases were categorized into low and high expression ( $n = 29$ , 50%). XRCC1 immunoexpression was significantly higher in cases of early stage lesions I and II ( $n = 23$ ; 62.2%) compared to advanced stages III and IV ( $n = 16$ , 80%,  $p = 0.05$ ). The Immunoexpression of p53 was significantly higher in cases of advanced lesion ( $n = 19$ ; 65.5%) and low in early stages ( $n = 17$ , 60.7%,  $p = 0.047$ ). None of the studied proteins showed association with each other, nor with the other clinical parameters and histopathological grading. Despite the significant association of the highest XRCC1 immunoexpression with better clinical staging and of p53 with the worst clinical staging, these results were not supported when the patients' outcome were analyzed. The results of this study indicate that XRCC1 and APE1 participate in the process of carcinogenesis of OTSCC, but the immunohistochemical expression of these proteins and also p53 and Ki67 did not show any association with prognostic parameters.

**Keyword:** Oral Cancer. Squamous cell carcinoma. DNA repair. Cell proliferation. Immunohistochemistry.

---

## *Lista de Figuras*

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Reparo por excisão de base no DNA.....	<b>41</b>
<b>Figura 2</b>	Reparo por excisão de nucleotídeo no DNA.....	<b>42</b>
<b>Figura 3</b>	Reparo por excisão de bases incompatíveis no DNA.....	<b>43</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura da XRCC1 e o estresse Oxidativo. Esquema panorâmico da resposta da XRCC1 e seus parceiros protéicos interativos, a uma ruptura de uma única cadeia de DNA induzida por um carcinógeno ambiental e estresse oxidativo.....	<b>49</b>
<b>Figura 5</b>	Domínios XRCC1 e locais de ligação com parceiros interativos com a proteína.....	<b>50</b>
<b>Figura 6</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo invasão perineural em pequeno fascículo nervoso (HE; Barra = 50µm) .....	<b>73</b>
<b>Figura 7</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo infiltrado linfocitário contínuo (HE; Barra = 500µm) .....	<b>73</b>
<b>Figura 8</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo pior padrão de invasão tipo 4 e escasso infiltrado linfocitário (HE; Barra = 100µm) .....	<b>74</b>
<b>Figura 9</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoreexpressão positiva de APE1 >50% no <i>front</i> de invasão tumoral (HiDef; Barra = 1000µm) .....	<b>75</b>
<b>Figura 10</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoreexpressão citoplasmática de APE1 (HiDef; Barra = 100µm) .....	<b>75</b>
<b>Figura 11</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoreexpressão nuclear e citoplasmática de APE1 (HiDef; Barra = 50µm) .....	<b>76</b>
<b>Figura 12</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoreexpressão positiva de XRCC-1 >50% no <i>front</i> de invasão tumoral (HiDef; Barra = 200µm) .....	<b>76</b>
<b>Figura 13</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoreexpressão de XRCC-1 (HiDef; Barra = 50µm) .....	<b>77</b>
<b>Figura 14</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta	

	imunoexpressão de p53 no <i>front</i> de invasão tumoral (HiDef; 78Barra = 200µm)	
	.....	<b>77</b>
<b>Figura 15</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoexpressão de p53 (HiDef; Barra = 50µm) .....	<b>78</b>
<b>Figura 16</b>	Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoexpressão de ki67 no <i>front</i> de invasão tumoral (HiDef; Barra = 500µm) .....	<b>78</b>

---

# *Lista de Quadros*

---

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Sobrevida com relação ao estadiamento clínico.....	<b>37</b>
<b>Quadro 2</b>	Avaliação histopatológica de risco proposta por Brandwein- Gensler et al., 2005.....	<b>66</b>
<b>Quadro 3</b>	Anticorpos que serão utilizados para a reação de imunoistoquímica.....	<b>67</b>

---

## *Lista de Tabelas*

---

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos casos de acordo com as características sociodemográficas e clínicas .....	<b><u>71</u></b>
<b>Tabela 2</b>	Distribuição absoluta e relativa dos parâmetros de análise histopatológica dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral segundo proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005) .....	<b><u>72</u></b>
<b>Tabela 3</b>	Distribuição dos casos de acordo com as características imunoistoquímicas .....	<b><u>74</u></b>
<b>Tabela 4</b>	Comparação do nível de imunexpressão de APE1 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunexpressão de outras proteínas.....	<b><u>79</u></b>
<b>Tabela 5</b>	Comparação do nível de imunexpressão de XRCC1 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunexpressão de outras proteínas .....	<b><u>80</u></b>
<b>Tabela 6</b>	Comparação do nível de imunexpressão de Ki67 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunexpressão de outras proteínas .....	<b><u>81</u></b>
<b>Tabela 7</b>	Comparação do nível de imunexpressão de p53 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunexpressão de outras proteínas.....	<b><u>82</u></b>
<b>Tabela 8</b>	Comparação entre a ocorrência de metástase linfonodal com comprovação de biópsia e gradação histopatológica de malignidade .....	



---

## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AP-1</b>	Do inglês, <i>activator protein 1</i> , traduzido como proteína ativadora 1
<b>APE1</b>	Do inglês, <i>apurinic/apyrimidinic endonuclease 1</i> , traduzido como AP – endonuclease apurínica/apurimidínica.
<b>BAX</b>	Do inglês, <i>BCL-2 associated protein X</i> .
<b>BER</b>	Do inglês, <i>base excision repair</i> . Via de reparo do DNA por excisão de bases.
<b>BRCA 1</b>	Do inglês, <i>breast cancer 1</i> .
<b>CBER</b>	Do inglês, <i>cAMP response element binding protein</i> , traduzido como proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP.
<b>CCE</b>	Do inglês, <i>squamous cell carcinoma</i> , traduzido como carcinoma de células escamosas.
<b>CCEO</b>	Do inglês, <i>oral squamous cell carcinoma</i> , traduzido como Carcinoma de células escamosas oral.
<b>CCNPH</b>	Do inglês, <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> , traduzido como câncer colorretal hereditário não polipose.
<b>CCELO</b>	Do inglês, <i>oral tongue squamous cell carcinoma</i> , traduzido como Carcinoma de células escamosas de língua oral.
<b>CSA</b>	Do inglês, <i>cockayne syndrome group a-associated genes</i> .
<b>CSB</b>	Do inglês <i>cockayne syndrome group b-associated genes</i>
<b>DNA</b>	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucleico.
<b>Egr-1</b>	Do inglês, <i>early growth response protein 1</i> , traduzido como proteína de resposta ao crescimento precoce 1.
<b>EROS</b>	Do inglês, <i>reactive oxygen species</i> , traduzido como Espécies reativas de oxigênio.
<b>GADD45</b>	Do inglês, <i>growth arrest and dna damage 45</i> .
<b>GLUT-1</b>	Do inglês, <i>glucose carrier-1</i> , traduzido como Transportador de glicose-1

<b>HIF-1</b>	Do inglês, <i>hypoxia-inducible factor 1</i> , traduzido como fator indutor de hipóxia-1.
<b>hM-LH1</b>	Do inglês, <i>human MutL homologue 1</i> .
<b>HM-SH2</b>	Do inglês, <i>MutS protein homolog 2</i> .
<b>hM-SH6</b>	Do inglês, <i>MutS protein homolog 6</i> .
<b>HPV</b>	Do inglês, <i>human papillomavirus</i> , traduzido como papiloma vírus humano.
<b>HR</b>	Do inglês, <i>homologous recombination</i> , traduzido como Recombinação homóloga.
<b>IBER</b>	Do inglês, <i>incompatible base excision repair</i> , traduzido como Reparo por excisão de bases incompatíveis
<b>IGF3</b>	Do inglês, <i>insulin-like growth factors 3</i> .
<b>IGF-BP3</b>	Do inglês, <i>insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
<b>INCA</b>	Do inglês, <i>national cancer institute</i> , traduzido como Instituto Nacional do Câncer.
<b>MDM2</b>	Do inglês, <i>murine double minute 2</i> .
<b>MIB-1</b>	Do inglês, <i>mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1</i> .
<b>MutL</b>	Do inglês, <i>DNA mismatch repair protein</i> .
<b>MutS</b>	Do inglês, <i>DNA mismatch repair protein</i> .
<b>MPG</b>	Do inglês, <i>methyadenine-DNA glycosylase protein</i> .
<b>NEIL2</b>	Do inglês, <i>protein endonuclease 8-like 2</i> .
<b>NER</b>	Do inglês, <i>nucleotide excision repair</i> , traduzido como reparo por excisão de nucleotídeo.
<b>NF-κB</b>	Do inglês, <i>nuclear factor NF-κB</i> , traduzido como fator nuclear κB.
<b>NHEJ</b>	Do inglês, <i>non-homologous end joining</i> .
<b>NTD</b>	Domínio N-terminal de XRCC1
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde.
<b>OGG1</b>	Do inglês, <i>8-hidroxi guanina DNA glicosilase</i> .

<b>Pax</b>	Do inglês, <i>paired box-containing proteins</i> .
<b>PD-L1</b>	Do inglês, <i>Programmed death-ligand 1</i> .
<b>PCNA</b>	Do inglês, <i>proliferating cell nuclear antigen</i> , traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular.
<b>PCR</b>	Do inglês, <i>polimerase chain reaction</i> , traduzido como reação em cadeia da polimerase.
<b>RNA</b>	Do inglês, <i>ribonucleic acid</i> , traduzido como ácido ribonucleico.
<b>TNM</b>	Do inglês, <i>tumor-node-metastasis</i> , sistema de estadiamento clínico que avalia: tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e envolvimento por metastases à distância (M).
<b>XPA</b>	Do inglês, <i>xeroderma pigmentosum type A</i> .
<b>XPB</b>	Do inglês, <i>xeroderma pigmentosum type B</i> .
<b>XPD</b>	Do inglês, <i>xeroderma pigmentosum group D</i> .
<b>XPG</b>	Do inglês, <i>xeroderma pigmentosum type G</i> .
<b>XRCC1</b>	Do inglês, <i>X-ray repair cross-complementing group 1</i> .

---

# *Sumário*

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>33</b>
2.1	CÂNCER DE BOCA .....	33
2.2	GENES DE REPARO DO DNA.....	39
2.3	APE1 .....	44
2.4	XRCC1 .....	48
2.5	p53 .....	51
2.6	Ki67 .....	56
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	64
4.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	64
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	64
4.4	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	64
4.4.1	<b>Critérios de inclusão da amostra .....</b>	<b>64</b>
4.4.2	<b>Critérios de exclusão da amostra.....</b>	<b>65</b>
4.5	ESTUDO CLÍNICO E MORFOLÓGICO .....	65
4.6	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO .....	66
4.6.1	<b>Método imunoistoquímico .....</b>	<b>66</b>
4.6.2	<b>Análise imunoistoquímica .....</b>	<b>67</b>
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	68
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	70
5.2	RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	71
5.3	RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA .....	74
5.4	RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	79
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>110</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>112</b>

---

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) representa 90% a 95% das neoplasias malignas da cavidade oral (WOLFF; FOLLMAN; NAST, 2012) e é considerado uma das principais ameaças globais à saúde pública (WARNAKULASURIYA, 2009; XIE et al., 2016). O CCE é considerado o sexto tumor maligno mais comum e o que apresenta maior taxa de mortalidade na região de cabeça e pescoço (GIOVANNACCI et al., 2016), acometendo com maior frequência, em cavidade oral, a borda lateral posterior e a superfície ventral da língua, áreas com piores prognósticos (AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016)

Os fatores que podem levar ao seu acometimento, é multifatorial, destacando-se fatores extrínsecos como fumo e álcool e intrínsecos como estado sistêmico, desnutrição e alterações genéticas cumulativas. Esses fatores refletem a suscetibilidade e a tendência do genoma para adquirir múltiplas alterações, o que conduz ao desequilíbrio no ciclo celular, incluindo divisão, diferenciação e apoptose. (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; NEVILLE et al., 2016).

Após exposição a agentes genotóxicos, proteínas responsáveis pelo reparo do DNA (deoxyribonucleic acid) são produzidas para remoção do dano genético. A via de reparo BER é a responsável pela reparação após dano devido ao estresse oxidativo, alquilação, desaminação e depurinação/despirimidação ou de hidrólise iniciada espontaneamente no DNA. Esta via inclui os genes *OGG1* (8-hidroxiguanina DNA glicosilase), *APE1* (X-Ray Repair Cross Complementing 1) e *XRCC1* (X-Ray Repair Cross Complementing 1) (SOUZA et al., 2011), sendo o *APE1* e o *XRCC1* alvos dessa pesquisa.

Segundo a literatura vigente, a *APE1* apesar de ser considerada uma enzima multifuncional, responsável pela remoção de resíduos de bases danificadas, também demonstrou estar envolvida na regulação de fatores de transcrição do DNA (como fos, jun, fator nuclear-κB e p53) (SOUZA et al., 2011). Já a *XRCC1*, aparentemente, não possui ação enzimática, mas atua no suporte a outros fatores de reparo, incluindo a *APE1* (BREM; HALL, 2005; ALMEIDA; SOBOL, 2007).

Embora defeitos em genes de reparo da via BER tenham sido investigados em outros tipos de câncer como o de próstata, osteossarcoma, gástrico, o conhecimento do valor prognóstico e seu papel em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é limitado (MAHJABEEN et al., 2014, QING et al., 2015).



Sabe-se que defeitos em genes de reparo podem levar à proliferação celular descontrolada, sendo esta considerada um precursor e preditor de tumorigênese (SWAMINATHAN et al., 2012).

Nesse processo de perda de controle do processo de proliferação celular destaca-se o *TP53*, que é um gene supressor de tumor bem conhecido. A proteína codificada por este gene, a p53, inibe funções como o ciclo celular quando ocorre algum dano inevitável à célula ou repara esses danos (SOUZA et al., 2011). Defeitos nesta proteína permitem que células alteradas proliferem descontroladamente, sendo hipotetizado que sua ação supressora parece ser influenciada pela proteína APE1 (WEI et al., 2016).

O Ki67 é o marcador imunoistoquímico considerado mais confiável para o processo de proliferação celular (BIRAJDAR et al., 2014), pois está presente em todas as etapas do ciclo celular. Desta forma, ele pode ser considerado um indicador molecular potencial no prognóstico de um tumor (XIE et al., 2016).

Diante da escassez de estudos sobre possível associação da expressão de genes de reparo do DNA com o processo de proliferação celular na carcinogênese oral (MAHJABEEN et al., 2014), o objetivo desta pesquisa foi analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo de DNA (APE1, XRCC1) e das proteínas envolvidas no ciclo celular (p53 e ki67), associando-as entre si e relacionando com parâmetros clínicos e histopatológicos em CCE de língua oral, já que é o local mais frequentemente acometido e com pior prognóstico, visando contribuir para o melhor entendimento da participação dessas proteínas no desenvolvimento desta neoplasia.

---

*Revisão de Literatura*

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DE BOCA

O câncer de boca é uma das principais ameaças globais à saúde pública (WARNAKULASURIYA, 2009; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011). Áreas caracterizadas por alta incidência dessa lesão estão localizadas no sul da Ásia, regiões do Pacífico, América Latina, incluindo o Brasil, e em partes da Europa Central e Oriental (WARNAKULASURIYA, 2009).

Dentre todos os tipos de cânceres 5% deles ocorrem primariamente em região de cabeça e pescoço, sendo que aproximadamente metade acomete a cavidade oral (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012). Segundo a última estimativa do INCA (Instituto Nacional do Câncer), era previsto para o ano de 2016 no Brasil 596.070 novos casos de câncer, sendo 15.490 em boca, correspondendo a um risco estimado de 11,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. No Nordeste, foi dada uma estimativa de 3.070 novos casos, sendo o quinto mais frequente em homens e o nono mais frequente em mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma.

Os tecidos orais podem originar vários tipos de cânceres como os carcinomas, adenocarcinomas salivares, sarcomas e o melanoma, sendo que a maioria dos cânceres orais (90%) são carcinomas de células escamosa (CCE) (MCLEOD; SAEED; ALI, 2005; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; WOLFF; FOLLMAN; NAST, 2012; INCA, 2011). O carcinoma de células escamosas oral (CCEO), também denominado carcinoma epidermoide oral, carcinoma espinocelular e carcinoma escamocelular, é o sexto tumor maligno mais comum, com incidência de mais de 500.000 casos por ano e o que apresenta maior taxa de mortalidade no segmento de cabeça e pescoço (ANTUNES et al., 2007; WARNAKULASURIYA, 2009; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; DURR; LI; WANG, 2013; GIOVANNACCI et al., 2016).

O câncer bucal, ou propriamente os carcinomas, já que são a maioria, podem ser divididos em três categorias: carcinomas de cavidade oral propriamente dita (incluindo os 2/3 anteriores da língua, mucosa jugal, assoalho da boca, gengiva inferior, gengiva superior; área retromolar e palato duro), carcinomas do vermelhão do lábio e carcinomas de orofaringe (palato mole, terço posterior da língua e região tonsilar) (NEVILLE; DAY, 2002; INCA, 2011).

Inicialmente o CCE pode apresentar-se como uma área eritroplásica, leucoplásica, leucoeritroplásica e até mesmo ulcerada em cerca de 70% dos casos e, em seguida, progride para a invasão de estruturas mais profundas, dando a aparência de uma massa firme e não móvel. Ele pode ser sintomático (dor, hemorragia, disfagia) em casos avançados ou um achado incidental durante um exame médico ou odontológico (MCLEOD; SAEED; ALI, 2005; MCDOWELL, 2006; SILVA; AMARAL; FRIAS-BULHOSA, 2010; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016). Cerca de 40% dos casos em cavidade oral ocorrem em borda lateral posterior e nas superfícies ventrais da língua. O assoalho é a segunda localização intraoral mais comum (NEVILLE; DAY, 2002; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer oral é o uso conjunto do fumo e do álcool (SILVA et al., 2011). Quando o hábito de fumar está associado ao etilismo, há efeitos sinérgicos na carcinogênese do tabaco. Além disso, aproximadamente 80% dos pacientes dependentes de álcool relatam fumar cigarros (KOHN; TSOH, WEISNER, 2003). Estudo realizado por Znaor et al. (2003) constatou que o consumo de álcool juntamente com o hábito de fumar aumentava em quase 5 vezes a chance do indivíduo adquirir câncer oral.

Clinicamente, o CCEO está tipicamente associado a homens, acima dos 50 anos de idade e com histórico de uso excessivo de tabaco e/ou álcool. Entretanto, esse perfil vem mudando, visto que sua prevalência tem aumentado entre indivíduos mais jovens, do sexo feminino (GAETTI-JARDIM et al., 2010) e em não fumantes (CUARADO; HASHIBE, 2009). Esse fato pode ser atribuído a mudanças no estilo de vida das mulheres, com o maior consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, e aumento na sua expectativa de vida (PATEL et al., 2011). Pacientes não fumantes que desenvolvem câncer provavelmente possuem maior susceptibilidade a mutações genéticas ou estão sujeitos a ação de agentes patogênicos ambientais ou virais ainda desconhecidos (DURR; LI; WANG, 2013).

A localização anatômica do CCE é fator de influência no prognóstico, considerando-se que os tumores apresentam comportamentos clínicos diferentes conforme sua localização (COSTA et al., 2002). O carcinoma de células escamosas de língua é o tipo de câncer da cavidade oral mais relacionado com metástases para linfonodos. Esta disseminação ocorre através de uma rica rede de vasos linfáticos

que anatomicamente se localizam muito próximo aos músculos, localizado mais superficialmente o que facilita a propagação rápida para linfonodos cervicais. Essas características tornam a língua mais susceptível a invasão local e metástases (LIM, 2006; SANO; MYERS, 2007). Dessa forma, pacientes com essa neoplasia têm prognóstico significativamente pior quando comparado com lesões similares de orofaringe, laringe e aquelas situadas em outras localizações da cavidade oral (RUSTHOVEN et al., 2008).

O padrão-ouro para o diagnóstico de lesões neoplásicas malignas é o exame histopatológico. Técnicas de biópsia incisional ou excisional são os métodos mais confiáveis para coletar um espécime cirúrgico para avaliação microscópica (GIOVANNACCI et al., 2016).

Histopatologicamente, o CCEO caracteriza-se por uma desordem proliferativa de células do epitélio de revestimento, que expressa graus variados de similaridade com suas células de origem. As células do CCEO exibem citoplasma bastante eosinofílico, núcleo vesicular de tamanho aumentado com hiperchromatismo, pontes intercelulares proeminentes, aumento do número de figuras de mitoses típicas ou atípicas, pleomorfismo celular, pleomorfismo nuclear e pérolas de ceratina. Estas células invadem o tecido conjuntivo de forma isolada ou em grupos, formando cordões, ninhos e lençóis (BATISTA et al., 2010; NEVILLE et al., 2016).

O CCEO caracteriza-se por apresentar frequente invasão perineural, recidivas precoces, altas taxas de invasão local e metástase, possuindo, portanto, grande agressividade. Muitos pacientes morrem em decorrência da disseminação local ou regional da doença (OGBUREKE et al., 2007; SILVA et al., 2011). Por tais motivos se faz necessário realizar o diagnóstico precoce dessa patologia, visto que sua detecção em estágios iniciais reduz a mortalidade, morbidade e diminui a extensão da cirurgia necessária ao tratamento, que leva frequentemente a perda da função, mutilação, depressão e pobre qualidade de vida (MEHROTRA; GUPTA, 2011).

Dependendo do local, da extensão do tumor primário e do status dos linfonodos cervicais, o tratamento do câncer de cavidade oral pode ser cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou uma combinação de ambos. A cirurgia para ressecção dos tumores primários deve incluir sempre toda lesão tumoral e margem de tecido livre de tumor em todas as dimensões (mínimo de 1,0 cm de margem), sempre confirmada no ato cirúrgico por exame de congelação (INCA, 2011).

O câncer oral ocorre mais comumente em homens de meia-idade e idosos (60 anos). Embora um número perturbador destas malignidades também esteja sendo documentado em adultos mais jovens e em mulheres nos últimos anos. A forte associação entre cânceres de cavidade oral e orofaringe com uso de tabaco é bem estabelecida. O risco de desenvolver câncer oral é de 5 a 9 vezes maior para fumantes do que para não fumantes, e esse risco pode aumentar para 17 vezes para fumantes inveterados (que fumam 80 ou mais cigarros por dia). O uso de álcool também é um fator de risco. Etilistas crônicos (maior que 100 gramas de álcool por dia) tem um risco 30 vezes maior de desenvolver câncer oral e de orofaringe. Significativo é o efeito sinérgico do álcool com o fumo. Fumantes e etilistas inveterados apresentam um risco 100 vezes maior de desenvolver uma doença maligna (NEVILLE; DAY, 2002; WARNAKULASURIYA, 2009; TANAKA, T.; TANAKA, M.; TANAKA, T., 2011; AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016).

O desenvolvimento do câncer oral é uma de várias etapas relacionadas ao uso de tabaco, álcool, ao processo multifocal envolvendo cancerização de campo e carcinogênese. A carcinogênese oral é um processo multifocal altamente complexo que ocorre quando o epitélio escamoso é afetado por várias alterações genéticas decorrentes de fatores endógenos e exógenos. Os principais fatores de risco além do álcool e tabaco são: alterações genéticas, inflamação, infecção e lesões pré-neoplásicas (WARNAKULASURIYA, 2009; TANAKA, T.; TANAKA, M.; TANAKA, T., 2011; AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016).

Apesar dos grandes avanços que melhoraram o prognóstico de vários tipos de câncer, para o câncer de boca, por mais que ocorra em área de fácil visualização, o diagnóstico tardio ainda é uma realidade, apresentando altos índices de mortalidade. A sobrevida em 5 anos está diretamente ligada à fase de diagnóstico e à prevenção. Esforços nesse sentido são importantes não somente para diminuir a incidência, mas também para melhorar a sobrevida. O diagnóstico precoce depende da detecção de qualquer alteração por parte do paciente e procura por atendimento especializado o quanto antes. Sendo necessário ainda o conhecimento por parte do profissional para identificação dessas neoplasias (NEVILLE; DAY, 2002; MCLEOD; SAEED; ALI, 2005; REMMERBACH et al., 2009; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016)

A compreensão da carcinogênese permite sugerir que quanto maior for o tempo para o diagnóstico do câncer oral, ele estará em estágios mais avançados e,

consequentemente, maior será a probabilidade de metastatizar, ter pior prognóstico e menor sobrevida. A taxa de progressão é muito difícil de ser prevista e varia de acordo com a velocidade de crescimento e agressividade tumoral (MCLEOD; SAEED; ALI; 2005).

O estadiamento clínico do câncer de boca é importante para estabelecer um tratamento adequado e determinar o prognóstico. Para tal finalidade, utiliza-se o sistema de estadiamento clínico TNM (Classificação de Tumores Malignos), onde T representa o tamanho do tumor primário, N indica o estado de linfonodos regionais, e M indica a presença ou ausência de metástases à distância. As lesões iniciais (I-II) têm um prognóstico melhor em comparação com as lesões avançadas (III - IV), como pode-se observar no quadro 1 (NEVILLE; DAY, 2002; SOBIN; WITTEKIND, 2009; INCA, 2011; GIOVANNACCI et al., 2016). Porém, observa-se que alguns casos de CCE, diagnosticados em estádios iniciais e tratados corretamente, evoluem com recorrências locais e disseminação metastática, determinando, por fim, o óbito do paciente. Tais constatações têm suscitado a busca por outros fatores prognósticos capazes de suplementar o sistema TNM (LINDENBLATT et al., 2012).

**Quadro 1 – Sobrevida com relação ao estadiamento clínico.**

Sítio primário	Sobrevida em cinco anos Percentual / Estádio			
	I	II	III	IV
<b>Porção oral da língua</b>	35-85	26-77	10-50	0-26
<b>Assoalho da boca</b>	58-75	40-64	21-43	0-15
<b>Rebordo gengival</b>	73	41	17	0-10
<b>Mucosa jugal</b>	77-83	44-65	20-27	0-18
<b>Área retromolar</b>	70	57,8	46,5	0-10
<b>Palato duro</b>	60-80	40-60	20-40	0-30

Fonte: INCA, 2011.

Além do TNM, o uso de sistemas de gradação histológica de malignidade, vem sendo amplamente estudada e resultados satisfatórios vêm sendo obtidos (ANNEROTH; HANSEN; SILVERMAN, 1986; ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1986; BRYNE et al., 1989; KADEMANI et al., 2005; WOOLGAR et al., 2006). Para

Anneroth, Batsakis e Luna. (1987), o melhor valor preditivo da avaliação histológica ocorre pelo fato de que, dessa maneira, se torna possível visualizar alterações antes mesmo que elas sejam percebidas clinicamente.

Broders (1920) foi o primeiro a propor um método para gradação do carcinoma de células escamosas oral. Embora essa classificação tenha sido considerada um marco inicial, estudos posteriores encontraram um alto índice de discordância entre os examinadores. Além de uma falta de associação entre este sistema e o prognóstico dos carcinomas de células escamosas orais (LOURENÇO et al., 2007).

Tais constatações levaram ao desenvolvimento de vários outros sistemas de gradação de malignidade para o CCEO, como os de Lund et al. (1975), Anneroth e Hansen (1984) e Anneroth, Batsakis e Luna (1987). Por analisarem não apenas as características das células tumorais, mas também hábitos de vida relacionados ao hospedeiro, os sistemas propostos por Anneroth e Hansen (1984) e Anneroth, Batsakis e Luna (1987) se destacaram em relação aos demais.

Posteriormente, Bryne et al. (1989) sugeriram uma modificação no sistema descrito por Anneroth, Batsakis e Luna (1987), sendo um dos mais utilizados. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs um sistema de gradação histológica fundamentado no grau de diferenciação celular, classificando os espécimes de CCEO em três categorias: as lesões bem diferenciadas, as moderadamente diferenciadas e as pouco diferenciadas (BARNES et al., 2005)

Os sistemas de gradação citados não apresentavam, muitas vezes, correlações significativas e consistentes com o prognóstico e a sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e o oral, especificamente. Brandwein-Gensler et al. (2005) propuseram um novo modelo de gradação, o qual denominaram Avaliação de Risco Histopatológico. Este modelo foi capaz de prever a recorrência local e sobrevida geral de um grupo de pacientes com CCEO de cavidade oral e orofaringe. Uma categoria de risco é determinada pelo exame de espécimes primários provenientes de ressecção, nos quais quantifica-se 3 variáveis histológicas significantes: (1) pior padrão de invasão tumoral no front de invasão, (2) invasão perineural, (3) resposta linfocítica do hospedeiro no front de invasão tumoral. Esse modelo classifica os pacientes em grupos de baixo, intermediário e alto risco. Em 2010, a mesma equipe validou esse modelo em uma nova coorte de pacientes (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005).



## 2.2 GENES DE REPARO DO DNA

O DNA humano, assim como qualquer outra molécula celular, sofre ataques contínuos tanto de espécies reativas intracelulares, quanto de agentes ambientais (COOPER; HAUSMAN, 2000; WOOD et al., 2001; CLANCY, 2008). Dentre os agentes mutagênicos endógenos, destaca-se os processos de hidrólise, espécies reativas de oxigênio (EROs) e metabólitos, que podem atuar como agentes alquilantes (capazes de transferir um grupo etil ou metil às bases do DNA). A luz solar ultravioleta, fumaça de cigarro inalado e fatores provindos da dieta são exemplos de fatores ambientais citotóxicos (WOOD et al., 2001; CLANCY, 2008). Além disso, o DNA possui uma instabilidade química intrínseca como, por exemplo, por meio da própria enzima DNA polimerase, que pode adicionar nucleotídeos incorretos ou através da capacidade do DNA em sofrer espontaneamente desaminação e depuração hidrolítica (CLANCY, 2008; MARTEIJN et al., 2014).

Como o DNA é sede de informações gênicas, alterações na sua integridade e estabilidade são de consequências muito maiores do que modificações em outros componentes celulares, tais como o RNA (ribonucleic acid) e proteínas, pois podem resultar em alta frequência de mutações (COOPER; HAUSMAN, 2000; CLANCY, 2008) e aberrações cromossômicas capazes de ativar oncogenes ou inativar genes supressores tumorais e, assim, aumentar o risco de câncer (MARTEIJN et al., 2014).

Os genes supressores tumorais possuem a finalidade de codificar proteínas formadoras de uma rede de checagem de danos ao DNA, evitando o crescimento celular descontrolado. O mecanismo de ação dessas proteínas ocorre, principalmente, através do impedimento da progressão do ciclo celular e da replicação do DNA, porém, atualmente, sabe-se que elas agem de outras formas, como, por exemplo, por meio da alteração do metabolismo celular e manutenção da estabilidade genômica (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Esta última função é assegurada por genes supressores tumorais denominados genes de reparo de DNA, cujas proteínas monitoram, continuamente, os cromossomos, corrigindo resíduos de nucleotídeos danificados gerados pela exposição a carcinógenos citotóxicos (WOOD et al., 2001).

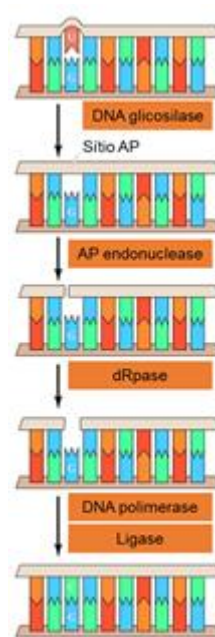
Os diferentes tipos de danos ao DNA podem ser reparados basicamente pelos seguintes mecanismos: reversão direta de dano, reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e reparo por excisão de bases

incompatíveis (IBER) (COOPER; HAUSMAN, 2000; WOOD et al., 2001; MARTEIJN et al., 2014).

A reversão direta do dano repara apenas alguns tipos de danos ao DNA como, por exemplo, na presença de dímeros de pirimidina, resultantes da exposição à radiação ultravioleta, e resíduos de guanina alquilados (COOPER; HAUSMAN, 2000). A forma mais comum de reparar uma grande variedade de danos ao DNA é por meio da via BER (COOPER; HAUSMAN, 2000; CLANCY, 2008). Nesse tipo de reparo, o DNA danificado é reconhecido e removido, quer seja na forma de bases livres ou de nucleotídeos, sendo o intervalo resultante então preenchido por síntese de uma nova cadeia de DNA, utilizando como molde a cadeia complementar não danificada (COOPER; HAUSMAN, 2000).

As proteínas envolvidas na BER excisam e substituem as bases de DNA que foram danificadas principalmente por EROs e hidrólise. O processo é iniciado pela enzima DNA glicosilase que libera a base modificada por meio da quebra da ligação N-glicosil, que mantém a base nitrogenada associada com o esqueleto de açúcar-fosfato. Isso irá formar no DNA um sítioapurínico ou apirimidínico (por isso chamado de sítio AP). Estes locais são reparados pela AP endonuclease, a qual cliva o DNA em sua porção 5' e adjacente ao local AP. O resultado dessa quebra gera duas terminações: uma 3'-OH e outra 5'-fosfato-desoxirribose. Este resíduo é removido pela enzima DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase) e o intervalo de base simples resultante é preenchido pela DNA polimerase e ligase (COOPER; HAUSMAN, 2000; WOOD et al., 2001) (Figura 1).

**Figura 1** – Reparo por excisão de base no DNA.



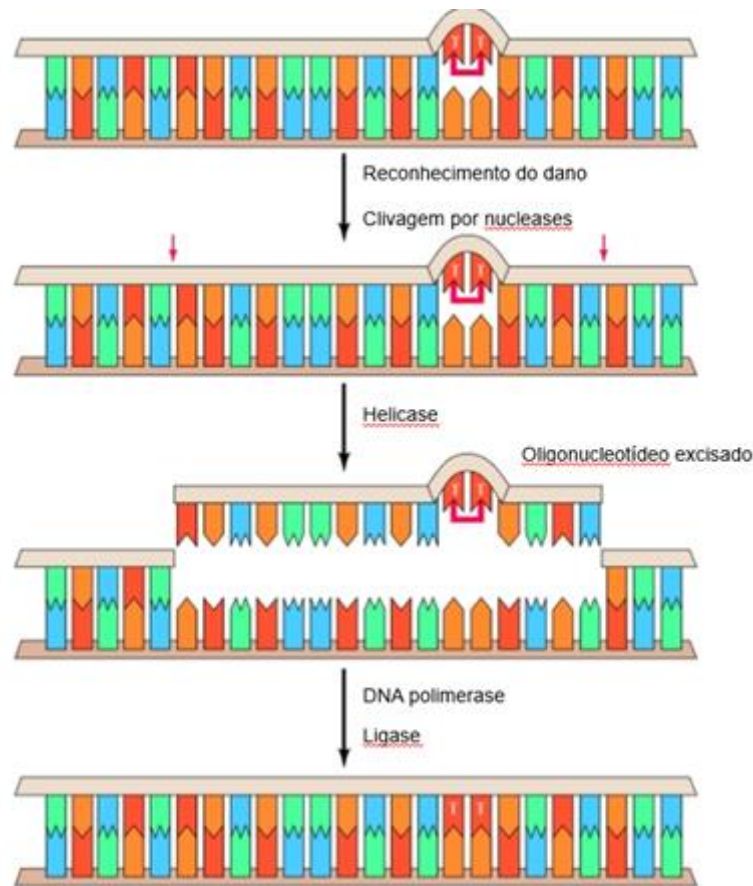
Fonte: Adaptado de Cooper e Hausman (2000).

A enzima DNA glicosilase é formada por *splicing* alternativo no núcleo e nas mitocôndrias, assim, essa enzima pode agir de formas diferentes, como através da excisão de bases danificadas por oxidação ou radiação ionizante, excisar purinas alquiladas e dímeros de pirimidina, além de reconhecer e excisar uracila e adenina danificadas (COOPER; HAUSMAN, 2000; WOOD et al., 2001).

De acordo com Hoeijmakers (2001), não foram identificados quaisquer distúrbios humanos causados por deficiências hereditárias de BER, no entanto polimorfismos específicos em XRCC1 estão associados a câncer de pulmão e outros tipos de neoplasias malignas (DIVINE et al., 2001).

O mecanismo da NER consiste na remoção de bases danificadas a partir da excisão de um oligonucleotídeo (COOPER; HAUSMAN, 2000) (Figura 2). A detecção do dano ao DNA pela NER pode ocorrer em nível de genoma global (GG-NER) ou através do reparo acoplado a transcrição (TCR), o qual concentra-se nos danos que boqueiam o alongamento da RNA polimerase (HOEIJMAKERS, 2001; MARTEIJN et al., 2014). A NER destaca-se dentre as vias de reparo do DNA por conseguir identificar a mais vasta gama de lesões no DNA não estruturalmente relacionadas (COOPER; ROBERT, 2000; HOEIJMAKERS, 2001; MARTEIJN, et al., 2014).

**Figura 2** – Reparo por excisão de nucleotídeo no DNA.



Fonte: Adaptado de Cooper e Hausman (2000).

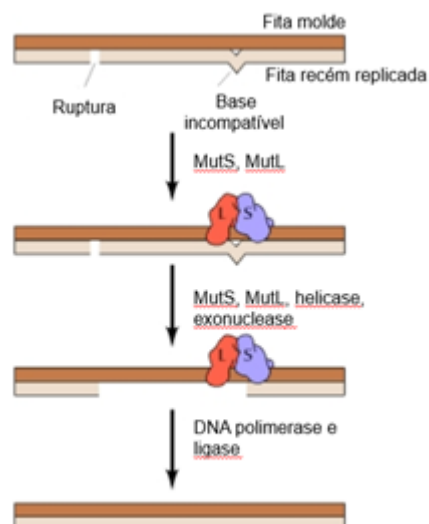
Há pelo menos três síndromes associadas a defeitos na via NER: xeroderma pigmentoso, síndrome de Cockayne e tricotiodistrofia, sendo todas caracterizadas por sensibilidade ao sol. Pacientes com xeroderma pigmentoso apresentam marcante predisposição ao câncer de pele induzido pelo sol devido mutações em um dos setes genes envolvidos (*XPA*- xeroderma pigmentosum type A; *XPG*- xeroderma pigmentosum type G). Indivíduos com a síndrome de Cockayne não apresentam qualquer predisposição ao câncer devido suas células serem particularmente sensíveis à apoptose, protegendo-os, assim da tumorigênese, porém causando-lhes envelhecimento precoce. Os genes mutados nessa síndrome são *CSA* (cockayne syndrome group a - associated genes) ou *CSB* (cockayne syndrome group b-associated genes). A tricotiodistrofia compartilha muitos achados em comum com a síndrome de Cockayne, mas com as características adicionais de cabelo frágil, unhas e pele escamosas. Mutações nos genes *XPD* (xeroderma pigmentosum type

D) ou *XPB* (xeroderma pigmentosum type D) podem originar as três doenças (COOPER; HAUSMAN, 2001; HOEIJMAKERS, 2001).

O mecanismo de BER reconhece e remove os nucleotídeos incompatíveis que foram incorporadas durante a replicação do DNA e insere/deleta “*loops*” (variando de 1 a 10 ou mais bases). Muitas dessas bases incompatíveis já são removidas pela própria DNA polimerase, sendo que aquelas remanescentes são removidas a partir da cadeia de DNA recém replicada por enzimas específicas de IBER (HOEIJMAKERS, 2001; COOPER; HAUSMAN, 2001). Defeitos no mecanismo de BER aumentam drasticamente as taxas de mutação, alimentando o processo de oncogênese (HOEIJMAKERS, 2001). Assim, defeitos nesse mecanismo estão associados com cânceres hereditários e esporádicos, especialmente câncer de cólon (MARINUS, 2012).

O mecanismo de reparo de BER é iniciado pela proteína MutS (DNA mismatch repair protein) que reconhece no DNA a base incompatível e forma um complexo com MutL (DNA mismatch repair protein). Esse complexo se une a outras duas proteínas (helicase e exonuclease), havendo a quebra na fita recém replicada no DNA exatamente entre o ponto de ruptura (que estariam presentes em DNA recém replicado) e o pareamento incompatível (Figura 3).

**Figura 3** – Reparo por excisão de bases incompatíveis no DNA.



Fonte: Adaptado de Cooper e Hausman (2000).

Mutações germinativas em hM-LH1 (human MutL homologue 1) e hM-SH2 (MutS protein homolog 2) juntas acometem aproximadamente metade de todos os

pacientes portadores de câncer colorretal não polipose hereditários (CCNPH), sendo o hM-LH1 responsável por mais de 60% desses casos. Defeitos em hM-SH6 causam CCNPH atípico e de início tardio. Isso é consistente com o fato de que a perda de hM-LH1 e hM-SH2 está associado com a completa inativação de IBER. O motivo porque defeitos de IBER causam preferencialmente cânceres de cólon, endométrio e ovário ainda não é claro (HOEIJMAKERS, 2001).

### 2.3 APE1 (Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1)

A endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE1) desempenha um papel importante em múltiplos processos biológicos como o controle da divisão celular e o processo de envelhecimento. Ela pode reparar danos no DNA e suprimir a tumorigênese através da manutenção da estabilidade do genoma (QING et al., 2015). Após clonagem em 1991, foi descrita primeiro como uma proteína enzimática de reparo do DNA e como proteína redox no ano seguinte (TELL et al., 2009), porém, o mecanismo pelo qual a APE1 está envolvida no desenvolvimento do câncer permanece desconhecida (TELL; DEMPLE, 2014).

Uma série de doenças humanas como as neurodegenerativas, cardiovasculares e o câncer resultam de dano oxidativo no DNA, causadas por fatores endógenos e exógenos (THAKUR et al., 2014). A resposta celular ao estresse oxidativo é um processo biológico complexo. Desta forma, a APE1 (também chamado HAP1 ou APEX, e aqui referido APE1) é uma proteína vital que atua como regulador mestre essencial desta resposta (TELL et al., 2009; AL-ATTAR; GOSSAGE; FAREED, 2010; TELL; DEMPLE, 2014).

Está bem estabelecido que uma grande quantidade de lesões em bases é induzida em genomas de células de mamíferos por diferentes agentes químicos, dentre os quais as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel dominante. Estas lesões, se não forem adequadamente reparadas, tornam-se a base para uma variedade de doenças (incluindo o câncer) e o envelhecimento. A via BER é o caminho mais utilizado para lidar com danos em pares de bases. Essa via também está envolvida nas rupturas de cadeia simples de DNA induzidas por radicais livres. Uma das principais enzimas da via BER em mamíferos é a APE1 (TELL et al., 2009; AL-ATTAR; GOSSAGE; FAREED, 2010).

As reações básicas da via BER exigem a atividade coordenada de um certo número de enzimas incluindo: (A) uma DNA glicosilase capaz de excisar uma base modificada; (B) uma endonuclease AP, tal como APE1, que cliva a ligação fosfodiéster 5', gerando 3'OH e 5'dRP terminal; (C) uma atividade de exonuclease ( $\alpha$ -polimerase, FEN, APE1); (D) uma polimerase de DNA ( $\alpha$ -polimerase, XRCC1, polimerase com PCNA) e, finalmente, uma atividade de ligação (DNA ligases I e III, XRCC1) (TELL et al., 2009; AL-ATTAR; GOSSAGE; FAREED, 2010).

Todos os passos da via BER são finamente orquestrados, tanto do ponto de vista termodinâmico como cinético. Uma reparação precisa da base danificada evita a geração de produtos intermediários que sejam tóxicos para a célula. Isso implica na interação coordenada de vários intervenientes no processo BER e, quando necessário, sua interação com o mecanismo de replicação do DNA, como demonstrado pela co-imunoprecipitação das proteínas de reparação de BER com ciclina A e proteínas de replicação do DNA (TELL et al., 2009).

A APE1 desempenha seu papel em vários contextos. É uma proteína com função dupla, envolvida tanto nas vias de reparo de excisão de base no DNA (BER) quanto na regulação transcricional eucariótica da expressão gênica. Este efeito é obtido como co-ativador redox de fatores de transcrição, como a proteína de resposta ao crescimento precoce 1 (Egr-1- early growth response protein 1), fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B- nuclear factor NF- $\kappa$ B), p53, Fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1- hypoxia-inducible factor 1), proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CBER- cAMP response element binding protein), proteína ativadora 1 (AP-1- activator protein 1) e Pax (paired box-containing proteins) em diferentes sistemas celulares. Essas duas atividades biológicas estão localizadas em dois domínios distintos. O N-terminal, contendo a localização nuclear, é dedicada principalmente para a atividade redox, através de Cys65, enquanto o C-terminal exerce a atividade enzimática nos sítios abásicos de DNA (TELL et al., 2009; QING et al., 2015; WEI et al., 2016).

Embora a parte C-terminal da proteína seja altamente conservada durante a filogenia, o N-terminal não é. As duas principais funções do APE1, redox e reparo, são completamente independentes em suas ações. Embora o local de reparo do DNA por APE1 tenha sido claramente delineado, o domínio redox não é totalmente esclarecido. O único resíduo de Cys requerido para a função redox completa é C65,

que está enterrado dentro da proteína. Sendo assim, o papel vital do APE1 parece ser devido à sua via de reparo (TELL et al., 2009).

Defeitos na etapa mediada por APE1 na via BER pode estar ligada à expressão gênica além de alterar o fator de transcrição APE1, em diferentes tipos de células em mamíferos. Sua expressão é principalmente nuclear e é crítico no controle de proliferação. Curiosamente, a expressão de APE1 está estritamente ligada a diferentes processos tumorigênicos. A necessidade de APE1 para a sobrevivência celular e sua frequente sobreexpressão em células tumorais sugerem fortemente um papel desta proteína na prevenção da morte celular e no controle da proliferação celular. No entanto, APE1 tem habilidade para ativar fatores de transcrição, tais como p53 e Egr-1, envolvidos principalmente no controle do ciclo celular (TELL et al., 2009; THAKUR et al., 2014).

A proteína APE1 também pode estar localizada dentro das mitocôndrias em diferentes tipos de células, mas o papel nesta organela não foi completamente elucidado, bem como o mecanismo regulador molecular. O fato de APE1 ser essencial para a viabilidade celular foi demonstrado por estudos genéticos. Knockout de APE1 em Ratinhos provoca letalidade embrionária pós-implantação em dias E5 a E9 e tenta isolar APE1-knockout estável (TELL et al., 2009; TELL; DEMPLE, 2014).

A superexpressão de APE1 foram encontradas em vários tipos de câncer e estão correlacionadas com invasão, metástase e quimio ou radio-resistência (TELL; DEMPLE, 2014; QING et al., 2015; WEI et al., 2016). No entanto, a desregulação de APE1 não é uma característica consistente em todos os tumores e seu papel na tumorigênese está atualmente em debate. Um estudo anterior sugeriu que a inibição da função redox de APE1 poderia dificultar a proliferação celular em câncer de próstata, reduzindo a atividade de ligação de NF- $\kappa$ B. Em contraste, outro estudo descobriu que a inibição da expressão de proteínas APE1 e VEGF diminuiu a proliferação celular e angiogênese em osteossarcoma. Da mesma forma, foi proposto que a sobreexpressão de APE1 aumentou a tumorigênese do câncer gástrico. Mas a relação entre APE1 e vários tipos de câncer ainda não é clara (QING et al., 2015).

A associação entre a imunoexpressão do ligante de morte programada-1 (PD-L1) e o APE1 com o prognóstico foi investigada em 107 casos de carcinoma gástrico humano. As taxas de expressão positiva de PD-L1 e APE1 foram de 50,5% e 86,9%, respectivamente. Expressões positivas das duas proteínas foram significativamente



associadas à profundidade de invasão, metástase linfonodal, tipo histopatológico, sobrevida global e estágio T mais elevado. A expressão de PD-L1 em cânceres gástricos altamente diferenciados foi maior do que em cânceres pouco diferenciados ( $p=0,008$ ). Houve correlação entre a imunoexpressão das duas proteínas. A profundidade de invasão foi um fator prognóstico significativo, mas não houve relação significativa com PD-L1, APE1, prognóstico e outras características. A desregulação de PD-L1 e APE1 pode contribuir para o desenvolvimento e pior prognóstico do câncer gástrico. Esses resultados sugerem que a alta expressão de PD-L1 e APE1 é um fator de risco para o câncer gástrico e possível biomarcador para prever o prognóstico. O direcionamento das vias de sinalização PD-L1 e APE1 pode ser uma nova estratégia para a terapia imune ao câncer e terapia direcionada para o câncer gástrico, especialmente em pacientes com invasão profunda e metástases (QING et al., 2015).

Al-Attar, Gossage e Fareed (2010) investigaram se a expressão imunoistoquímica da APE1 teria impacto sobre resultados clinicopatológicos em câncer de ovário, gastro-esofágico e pancreático-biliar. No câncer de ovário, a expressão nuclear de APE1 foi observada em 71,9% dos tumores e correlacionada com o tipo de tumor e taxa de sobrevida. Nos cânceres gastro-esofágicos previamente expostos a quimioterapia neoadjuvante, 34,8% dos tumores foram positivos no núcleo, correlacionando-se com menor sobrevivência, enquanto a localização citoplasmática correlacionou-se com a desdiferenciação tumoral. No câncer pancreático-biliar, a coloração nuclear foi observada em 44% dos tumores. A ausência de coloração citoplasmática foi associada com invasão, invasão vascular e tumores pouco diferenciados. Concluíram que as correlações clinicopatológicas positivas da expressão de APE1 sugerem que APE1 é um alvo potencial de fármaco em pacientes com câncer de ovário, gastro-esofágico e pancreático-biliar.

Em um estudo imunoistoquímico com 146 CCEOs de cabeça e pescoço, Hsia et al. (2016) detectaram elevada imunoexpressão de APE1 em 52,73% dos casos, o que foi correlacionado com a presença de metástase linfonodal, estando significativamente associada a um pior prognóstico e resposta ao tratamento reduzida. Mahjabeen et al. (2014) também encontraram elevada imunoexpressão de APE1 em 50 casos de CCEOs de cabeça e pescoço, sendo essa associada a um pior grau de malignidade. Outro estudo detectou imunoexpressão nuclear de APE1 em 92,3% dos 65 casos de carcinoma esofágico estudados. Os autores não

observaram a expressão desta proteína em amostras normais de tecido esofágico (NAGOYA et al., 2014).

#### 2.4 XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1)

Danos ao DNA desempenham um papel importante na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento. Há uma série de eventos químicos que levam aos danos no DNA incluindo hidrólise, exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros metabólitos reativos. Estes eventos resultam de processos metabólicos endógenos, ou são desencadeados pela exposição a produtos químicos exógenos.

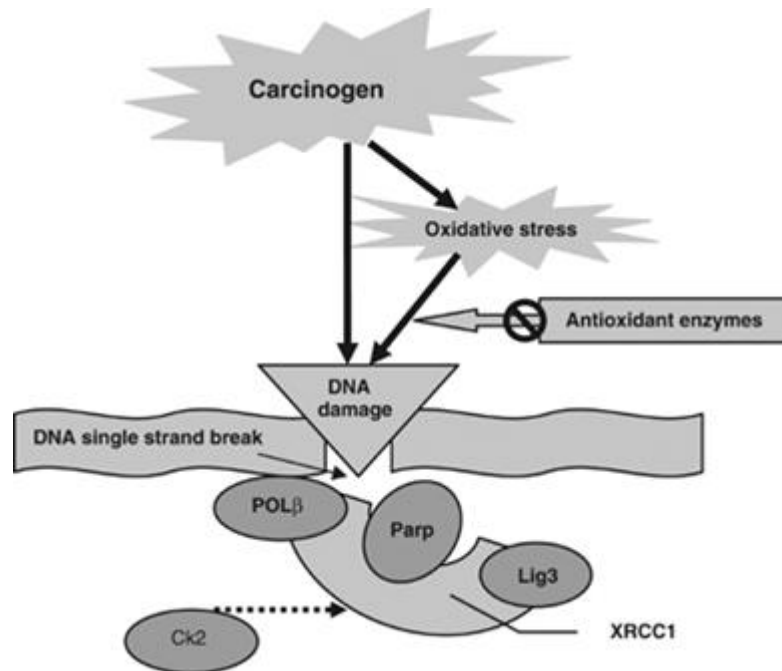
É evidente que as mutações relacionadas a danos no DNA são causadas por fatores endógenos que são modulados por fatores exógenos, e é provável que essa combinação desempenhe um papel importante em muitos casos de câncer. O estresse oxidativo do DNA está presente em muitos tecidos incluindo o tecido tumoral (DE BONT; VAN LAREBEKE, 2004).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs excede os mecanismos naturais de defesa do corpo, causando danos a macromoléculas como o DNA. Qualquer alteração na eficácia do reparo do DNA irá alterar os níveis de estado estacionário de modificações oxidativas do DNA, o que por sua vez afeta a taxa de mutação e, finalmente, a incidência de câncer. Os danos oxidativos em pares de bases e as rupturas são os tipos mais freqüentes de danos ao DNA causados por EROs e se não reparados, podem levar a danos mais graves como a quebra da dupla cadeia, que contribui para o desenvolvimento do câncer. Há assim uma grande apreciação pelos sistemas moleculares concebidos para reparar o DNA danificado (THOMPSON; WEST, 2000).

Existem diversos genes responsáveis pelo reparo celular. O dano em bases nitrogenadas é manuseado por um processo denominado de reparo por excisão de base. Um gene que está emergindo como um elemento essencial na reparação de bases danificadas é o *XRCC1* (X-ray repair cross-complementing group 1) que está localizado na posição 19q13.2 (THOMPSON et al., 1990; CALDECOTT, 2003). Ele é composto por 17 éxons e tem uma distância genômica de 32 kb (THOMPSON; WEST, 2000). Esse gene possui papel fundamental no reparo do rompimento de fitas simples de DNA causada por oxidação de células humanas, de forma a ligar-se à enzima DNA ligase III (MASSON et al., 1998; CALDECOTT, 2003). No mecanismo de ação do gene *XRCC1* também há envolvimento de outras enzimas, como a DNA

polimerase- $\beta$  e a poli ADP-ribose polimerase. A deficiência desse gene torna o DNA hipersensível a esses danos (WANG et al., 2003; HU et al., 2004), conforme mostra a figura 4.

**Figura 4** – Estrutura da XRCC1 e o estresse Oxidativo. Esquema panorâmico da resposta da XRCC1 e seus parceiros protéicos interativos, a uma ruptura de uma única cadeia de DNA induzida por um carcinógeno ambiental e estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de Ladiges (2006).

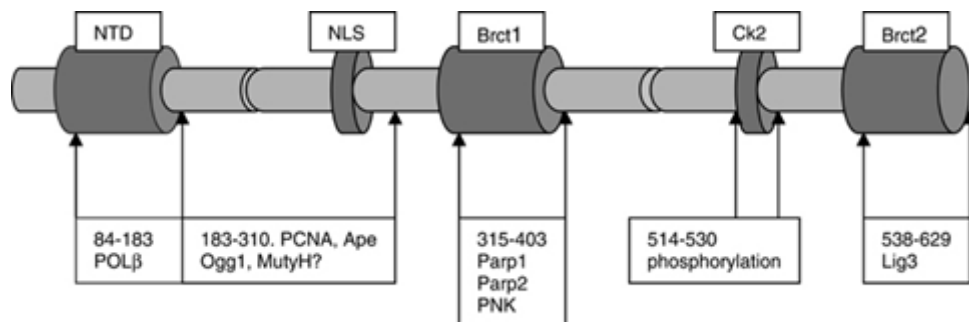
*XRCC1* foi o primeiro gene humano envolvido no reparo a ser clonado (THOMPSON; WEST, 2000). As células sem o produto gênico são hipersensíveis à radiação ionizante, peróxido de hidrogênio, camptotecina e agentes alquilantes (CALDECOTT, 2003). Um estudo mostrou que o *XRCC1* é necessário para o reparo eficiente do DNA (BREM; HALL, 2005).

Essa proteína pertence ao grupo das proteínas *scaffold* (do inglês, andaime), que são reguladoras essenciais em diversas vias de sinalização. Sabe-se que tais proteínas regulam a transdução de sinais e ajudam a localizar componentes da via de sinalização, organizando-os em complexos. Atua no suporte a outros fatores de reparo, interagindo com a maioria dos componentes da BER, coordenando principalmente a função de enzimas que dão início à via, como MPG (methyladenine-DNA glycosylase protein), OGG1 and NEIL2 (protein endonuclease 8-like 2). *XRCC1* também interage com diversas outras proteínas envolvidas no

reparo do DNA pela via BER, incluindo DNA ligase IIIa, DNA polimerase beta, APE1, kinase/fofatase polinucleotídea e polimerases poli(ADP-ribose) 1 e 2 (PARP-1 and 2) (BREM; HALL, 2005; ALMEIDA; SOBOL, 2007).

Nenhuma atividade enzimática conhecida foi atribuída a XRCC1, mas foram identificados três domínios interativos, mais um sinal de localização nuclear e um local de fosforilação para Ck2 (LOIZOU et al., 2004). O domínio N-terminal (NTD) é o local para a ligação de POL beta (DIANOVA et al., 2004). O XRCC1 tem dois domínios que são conservados e foram identificados pela primeira vez em BRCA1 (breast cancer 1), e que medeiam as interações de proteínas (BEERNINK et al., 2005) (Figura 5).

**Figura 5:** Domínios XRCC1 e locais de ligação dos parceiros interativos com a proteína.



Fonte: Adaptado de Ladiges (2006).

Um estudo que analisou a expressão imunoistoquímica de XRCC1 em espécimes coletados de pacientes com CCEO de cabeça e pescoço observou uma subregulação de XRCC1 em tecido tumoral quando comparado ao controle positivo. Essa subregulação foi maior em tumores pobremente diferenciados, com resultados semelhantes aos observados para carcinomas de pulmão e de estômago e também em meduloblastoma. Foi observado também uma correlação inversa entre a imunoexpressão de XRCC1 e APE1 (MAHJABEEN et al., 2014).

Subregulação de XRCC1 também foi observada no processo de carcinogênese do trato gastrointestinal através de imunoistoquímica e PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). Os autores observaram menor expressão dessa proteína em pacientes com câncer gástrico pobremente diferenciado. Também relataram que tecidos saudáveis apresentavam uma maior expressão de XRCC1 quando comparados aos casos de câncer gástrico (WANG et al., 2010).

Baixa imunexpressão de XRCC1 foi relatado em carcinoma de bexiga. Sendo que, em um estudo com 157 casos, a maior imunexpressão desta proteína mostrou-se significativamente relacionada a uma melhor taxa de sobrevida. Os autores não observaram, nesse estudo, associação estatística entre a expressão de XRCC1 e APE1 (SAKANO et al., 2013).

## 2.5 P53 (Gene/proteína de supressão tumoral)

Os genes supressores de tumor são os que têm a característica de impedir que as células adquiram características malignas. Eles são geralmente responsáveis pela regulação de *check points* durante a progressão do ciclo celular, assim como pela monitorização da replicação do DNA e mitose (TSANTOULIS et al., 2007).

O gene supressor tumoral mais estudado é o gene *TP53*, que está localizado no cromossomo 17p. A proteína p53, que é codificada por esse gene, participa no controle do ciclo celular e também desempenha papel na apoptose de células com danos no DNA. Mutações nesse gene anulam sua atividade levando ao crescimento celular descontrolado, característica de células malignas (SWAMINATHAN et al., 2012).

A variedade de fatores, como o estresse celular e cofatores de transcrição podem influenciar a interação direta entre p53 e o reparo do DNA (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). Tais atividades ocorrem durante o desenvolvimento do câncer e resultam em mudanças biológicas, alterando o equilíbrio entre a apoptose e a sobrevivência celular (PETITJEAN et al., 2007; PASKULIN et al., 2012). Outros papéis para p53 têm sido estabelecidos, incluindo a senescência, angiogênese, autofagia e metabolismo de carbono e lipídeos (VOUSDEN; PRIVES, 2009).

O *TP53* é um gene regulador de uma extensa rede que garante a integridade do genoma frente a danos celulares, como alterações cromossômicas, depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais e ativação de oncogenes celulares (MENENDEZ et al., 2007; FERREIRA; ROCHA, 2010; PASKULIN et al., 2012; SHAHBAZI; LOCK; LIU, 2013).

Os tipos de estresse que promovem a ativação da p53 incluem as condições associadas com a iniciação e progressão do câncer. Desta forma, p53 é um ativador de transcrição de sequência específica, pois se liga a elementos dentro do genoma e ativa a transcrição de genes que residem nas imediações dos locais de ligação.

Existe um contexto celular, dentre eles a disponibilidade de sinais de sobrevivência, definido por eventos de sinalização intra e extracelulares, que promove alterações genéticas e afeta o estado funcional da p53 (OREN, 2003).

Quando as células sofrem agressão, a p53 se acumula no núcleo, sua principal localização, onde pode regular os seus alvos de transcrição para induzir os eventos como apoptose e parada do ciclo celular. No entanto, também pode ter alguma função de transcrição no citoplasma e raramente, por indução da apoptose, será encontrada na membrana (ZHANG; XIONG, 2001; ERSTER et al., 2004).

A p53 é uma molécula polipeptídica de 53 kD. Quando age como um fator de transcrição do ciclo celular, prende as células em fase G1 através da ativação da p21 ou desencadeia apoptose através da troca de genes que codificam co-fatores tais como BAX (BCL-2 associated protein X) e GADD45 (growth arrest and dna damage 45). Ela liga-se ao PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), um co-fator para ciclina D, inibindo assim a transição da fase G1 para a fase S. Também ativa o gene que codifica a proteína de ligação a IGF 3 (insulin-like growth factors 3) (IGF-BP3- insulin-like growth factor-binding protein 3), bloqueando o fator de crescimento de insulina, o que causa a apoptose (SCHLIEPHAKE, 2003).

A proteína p53 tem sua função supressora de tumor regulada de forma negativa, ou seja, inativada pelo gene *Mdm2* (murine double minute 2). As alterações genéticas das células tumorais, como a superexpressão da Mdm2, afetam seu estado funcional. A maior parte da regulação negativa de p53 é executada pela ligase de proteína ubiquitina Mdm2, que é um produto de um proto-oncogene expresso na maioria dos tumores (TANG et al., 2008; THOMASOVA et al., 2012; NAG et al., 2013). Mdm2 leva a expressão de p53 por três mecanismos. No primeiro, Mdm2 se liga a p53 no seu domínio de transativação e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição. No segundo, promove a exportação nuclear para o citoplasma. No terceiro, serve como uma ligase de ubiquitina e assim p53 é degradada (MICHAEL; OREN, 2003; THOMASOVA et al., 2012).

É considerada uma proteína não histona, ou seja, que permanece após as histonas serem removidas, regulada por acetilação e desacetilação. Os níveis de acetilação da p53 aumentam, como já descrito, em resposta ao estresse. Na ausência de estresse celular, ela é mantida em baixos níveis, sem exercer efeito sobre o destino da célula. As alterações genéticas que tenham impacto sobre a competência de outras proteínas associadas a apoptose, o controle do ciclo celular e

o reparo de danos ao DNA, são capazes de modular a probabilidade da ação da p53, bem como o resultado da ativação biológica e suas múltiplas interações para controlar o crescimento das células neoplásicas. A escolha de subconjuntos específicos de genes-alvo e as interações de p53 com outras proteínas podem fazer a diferença entre a vida e a morte da célula em questão. O contexto celular, realizado pelo equilíbrio intra e extracelular nos eventos de sinalização, define se a ativação de p53 poupará a célula ou levará à sua morte por apoptose. Quando os sinais de sobrevivência celular estão disponíveis, a ativação de p53 levará, provavelmente, à interrupção da progressão do ciclo celular. Na ausência de fatores de sobrevivência adequada, será mais provável que p53 conduza à apoptose (OREN, 2003).

A desregulação da supressão tumoral de p53 é observada em vários tipos de tumores, incluindo o câncer oral, e é conhecida por estar mutada em aproximadamente 70% dos tumores sólidos. A identificação de membros da sua via supressora, que podem estar alterados, possivelmente provam a importância dessa proteína em uma maior porcentagem de cânceres. Na biologia celular normal, ela atua como um regulador da síntese de DNA, sendo capaz de impor a parada do ciclo celular, ou ativar a apoptose sob estresse de replicação, interrompendo assim a proliferação de células potencialmente malignas. Como mencionado acima, a perda de heterozigose na região 17p13 nesse gene é muito comum em câncer oral (TSANTOULIS et al., 2007; JUREL et al., 2014).

Na carcinogênese oral as alterações iniciais parecem ocorrer na camada de células basais sob a influência de fumo, álcool e/ou outros carcinógenos e pode envolver a desativação do *TP53* e outros genes supressores de tumor. A transição do epitélio normal para o câncer invasivo é, frequentemente, acompanhada por inúmeras etapas que promovem a proliferação, angiogênese, invasão local e, eventualmente, disseminação metastática à distância (TSANTOULIS et al., 2007).

Esse gene supressor de tumor está inativado em vários tipos de cânceres humano e foi implicado como um acontecimento em vários tipos tumorais. Estudos sobre alterações moleculares, instabilidade genômica usando marcadores microsatélites e inativação do gene supressor de tumor p53 em cânceres e lesões orais foram relatados (SARANATH et al., 1999, MAHALE; SARANATH, 2000). A inativação do gene *TP53* através de mutações, elevada expressão, deleções e ligação a proteínas virais foi demonstrada em câncer oral em outras lesões orais

(RAYBAUD-DIOGÈNE et al., 1996; SARANATH; TANDLE; DOE, 1997; SARANATH et al., 1999).

O gene *TP53* parece estar mutado na transição de carcinoma superficial para invasivo. Essa alteração ocorre através de mutações pontuais e deleções. As mutações pontuais resultam em proteínas estruturalmente alteradas que sequestram as proteínas do tipo selvagem, inativando-a de uma forma "dominante-negativa". A deleção leva a uma redução e perda da expressão de p53 e das funções das proteínas. Foi demonstrado que a restauração da sua função em linhas celulares de câncer oral e demais tumores orais, induzidos em modelos animais, resulta na reversão do fenótipo maligno (JUREL et al., 2014).

Um polimorfismo no códon 72 do éxon 4 de p53, codificando para uma prolina (CCC) ou arginina (CGC), tem sido implicada na susceptibilidade a certos tipos de câncer, com aumento da prevalência Arg/Arg no câncer de colo do útero e genótipo Pro/Pro em câncer de pulmão (KAWAJIRI et al., 1993; JIN et al., 1995; MURATA et al., 1996; STOREY et al., 1998). Em outro estudo não se observou essa associação entre os genótipos Pro/Pro ou Arg/Arg e o aumento da suscetibilidade em câncer de mama, bexiga, colorretal e de cabeça e pescoço (KAWAJIRI et al., 1993; HAMEL et al., 2000; TANDLE; SANGHVI; SARANATH, 2001),

O valor prognóstico de p53 em câncer oral é incerto e alguns estudos não encontraram qualquer impacto na sobrevida dos pacientes. No entanto, sua expressão influencia no prognóstico do subconjunto de pacientes com baixo estadiamento clínico, sem linfonodos positivos, ou naqueles portadores de mutações *TP53* específicas. Curiosamente, tumores com esta mutação parecem ser mais resistentes à radioterapia e essa informação poderia ser vital para a seleção de um tratamento (TSANTOULIS et al., 2007).

Assim, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão do câncer oral ajudará a melhorar o prognóstico e a elaboração de novas formas de tratamento. No estudo de Swaminathan et al. (2012) verificou-se a expressão da ciclina D1 e p53 em carcinomas de células escamosas oral, bem como a correlação entre a expressão de ciclina D1 e p53 por meio de imunoistoquímica. Foram utilizados 20 fragmentos de CCEO e 10 de mucosa oral normal. A p53 foi positiva em 30% dos casos e a ciclina D1 em 40% dos casos normais. Para os CCEO a porcentagem positiva foi de 65% e 95% para p53 e ciclina D1, respectivamente. Nesse estudo, a expressão aumentada de p53 e ciclina D1 foi



observada em CCEO quando comparada com a mucosa oral normal e foi observada uma correlação positiva entre o aumento da expressão das proteínas em carcinomas.

A imunoistoquímica não define a existência de mutações genéticas, mas existem dados que sugerem a relação entre o prolongamento da estabilidade da proteína p53 e, conseqüentemente, a sua expressão imunoistoquímica, com mutações ocorrendo, principalmente as mutações oncogênicas. É possível que o acúmulo da proteína p53 em células tumorais possa, em alguns casos, indicar a existência de um defeito regulatório na sequência codificadora proteica no gene, ao invés de uma mutação. Observou-se discrepâncias entre a expressão da proteína p53 e a presença de mutações e, além disso, pode ocorrer a mutação no gene *TP53*, sem aumento na expressão da proteína (LORAND-METZE, 2004).

As células tumorais são geneticamente instáveis e acumulam rearranjos cromossômicos desequilibrados (PAMPALONA et al., 2012). Os telômeros, estruturas que formam as extremidades dos cromossomos, quando excessivamente curtos, promovem instabilidade cromossômica, observada no início da formação do câncer humano. O encurtamento dos telômeros ocorre devido à excessiva proliferação celular, com deficiência no ponto de checagem, por disfunção da p53, promovendo o aparecimento de extremidades não niveladas, levando a tipos complexos de anormalidades genômicas que são características das células tumorais (ARTANDI et al., 2000).

A tetraploidia, três réplicas para cada cromossomo, também é observada nos primeiros estágios da carcinogênese. Os telômeros curtos disfuncionais, associados à deficiência no ponto de checagem do ciclo celular, também por disfunção da p53, podem promover a formação de células tetraplóides. A inativação, das vias moduladas pela p53, ocorre em muitos tipos de tumores em ambiente permissivo para a proliferação de células anormais (PAMPALONA et al., 2012).

## 2.6 KI67 (Antígeno nuclear associado ao ciclo celular)

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular. Este engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos

componentes celulares em uma sequência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas. Existem pelo menos quatro fases distintas no ciclo celular: o período antes da síntese do DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M) que culmina na divisão celular; As células fora do ciclo celular estão na chamada fase G0 e podem permanecer nesta fase por tempo indeterminado (ARISAWA et al., 1999; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Estudos sobre os mecanismos envolvidos nesse processo, evidenciaram que estes são dirigidos por um grande número de macromoléculas controladoras, ativadas em sequências altamente organizadas e que funcionam como verdadeiros *check points*. Estas moléculas atuam como um sistema de controle do ciclo celular, sendo capazes de checar no final de cada fase, por exemplo, se as condições são favoráveis à mitose, se há dano ao DNA, ou se a replicação cromossômica está exata, permitindo, então, o início da fase subsequente. A existência de falhas neste sistema permite que células geneticamente anormais dividam-se, acumulando danos genéticos ocasionando, em consequência, o início da progressão das neoplasias (ARISAWA et al., 1999; SOUZA et al., 2011).

A proliferação celular descontrolada é considerada um dos mais importantes mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese, tendo assim, um grande significado prognóstico em uma variedade de tumores. Os marcadores de proliferação celular têm sido classificados em três categorias: marcadores de fração de crescimento; marcadores de fases específicas do ciclo celular e marcadores de tempo do ciclo celular. A fração de crescimento, isto é, a proporção que as células crescem dentro do ciclo, pode ser facilmente identificada pelo Ki67 ou anticorpo MIB-1 (mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1), identificando a expressão do antígeno nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular (MOTTA et al., 2009).

O emprego de marcadores biológicos na avaliação do comportamento clínico das neoplasias constitui importante instrumento auxiliar, posto que as alterações determinantes da progressão da carcinogênese é o resultado de numerosos eventos celulares que ocorrem a nível genético e bioquímico. A utilização de técnicas imunoistoquímicas, aliando simplicidade, facilidade de manuseio pelos patologistas e amplo uso para diagnóstico, favoreceram inúmeros estudos correlacionando os resultados obtidos com a gradação histológica e ao prognóstico das neoplasias (ARISAWA et al., 1999; ALVES et al., 2016).

O Ki67 é uma proteína não histônica, com peso molecular de 345 a 349 Kd, presente no núcleo em todas as fases do ciclo da divisão celular (G1, S e G2) exceto G0, alcançando sua maior expressão nas fases G2 e M1. Sua denominação foi decorrente de sua identificação por Kiel (Alemanha) na 67ª placa de cultura tecidual. É um antígeno monoclonal, de vida média de uma hora. O cromossomo 10 parece estar envolvido na síntese proteica determinante do ciclo celular. Assim, vários trabalhos referenciam o Ki67 como protetor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas, pois diagnostica a síntese do DNA na neoplasia com o aumento da marcação de células malignas com este antígeno (ARISAWA et al., 1999; BARBOSA et al., 2003; MOTTA et al., 2009; INWALD et al., 2013; ALVES et al., 2016).

Como o Ki67 é exibido em todas as fases do ciclo celular, controlando de forma adjunta a proliferação celular, sua presença é considerada como um "índice de proliferação" em tumores. A função precisa do antígeno Ki67 no ciclo celular ainda é pouco conhecida, mas tem sido sugerido que esta proteína está possivelmente associada ao nucléolo e aos componentes fibrilares, e ainda parece desempenhar um papel essencial na síntese de ribossomos durante a divisão celular. Nos cânceres orais, os pacientes com tumores de alta positividade (92%) ou metástase linfonodal tiveram desfecho desfavorável, e estudos indicaram que Ki67 poderia ser um importante fator prognóstico (KONDO et al., 2011; ALVES et al., 2016).

O estudo de Barbosa et al. (2003) identificou parâmetros clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e de proliferação celular (Ki67) no prognóstico de carcinoma indiferenciado de grandes células em glândulas salivares maiores (11 casos), através da análise com procedimentos histológicos e imunoistoquímicos e sua relação com o prognóstico nessas neoplasias. Os casos também foram revisados e subclassificados por perfis de positividade para citoqueratinas de alto e/ou baixos pesos moleculares. O índice mitótico e o índice de imunoproliferação celular (Ki67), apresentaram-se estatisticamente significativos, ao exibirem valores compatíveis com outras neoplasias de alto grau de malignidade das glândulas salivares maiores, destacando-se o carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide cístico e carcinoma acinar. A sub-classificação imunoistoquímica de positividade para citoqueratinas não apresentou diferenças estatisticamente

significativas em relação aos índices mitóticos e o índice de imunoproliferação celular (Ki67).

Angiero et al. (2008) avaliaram a expressão imunoistoquímica de p53, p16 e Ki67 em lesões pré-cancerosas e no CCE da cavidade oral. Foram examinados 54 espécimes de biópsia da cavidade oral obtidos durante um período de 3 anos, sendo 18 casos de mucosa normal/hiperplásica, 25 de displasia e 11 de CCEO invasivo. O p16 foi negativo em todos os grupos, enquanto p53 e Ki67, quando presentes, foram limitados à camada basal em mucosa oral normal. No grupo das displasias, o número de células positivas para p16-, p53- e Ki67 aumentou à medida que o grau de displasia progrediu. No grupo dos carcinomas invasivos, ocorreu expressão de p53 e p16 respectivamente em 81,8% e 54,5%, enquanto Ki67 foi elevado em todos os casos. A imunexpressão de p53 no epitélio displásico, em associação com Ki67, pode representar possíveis marcadores capazes de reconhecer a evolução de lesões potencialmente malignas em cavidade oral e ajudar na identificação do grau de displasia.

Observou-se a imunexpressão dos antígenos CA9, Ki67, transportador de glicose-1 (GLUT-1) e p53 em 107 indivíduos com carcinoma de células escamosas oral e examinou sua correlação com parâmetros clínico-patológicos. A análise de imunocoloração mostrou expressão de CA9 em 98% de indivíduos com câncer oral e a taxa de sobrevida que foi significativamente menor em indivíduos com expressão de antígeno CA9 em células com positividade de 50% ou mais. Os pacientes em T4, metástase linfonodal e pouco diferenciados, ou câncer em estágio IV com expressão de CA9 elevada ( $\geq 50\%$ ) tiveram pior resultado do que aqueles com baixa expressão de CA9. Embora a expressão de GLUT-1 tenha sido observada em 98% dos indivíduos, de forma semelhante à expressão de CA9, não foi observada correlação significativa entre a sua expressão e a taxa de sobrevida. Contudo, os indivíduos com metástase dos nódulos linfáticos apresentaram uma expressão de GLUT-1 significativamente mais elevada, demonstrando que este poderia ser um indicador de metástase em nódulos linfáticos. O Ki67 foi expresso em 92% dos indivíduos, mas não foi observada correlação com o desfecho. A expressão de p53 foi observada em 78% dos indivíduos, e verificou-se que muitos cânceres orais têm anomalias genéticas neste gene, mas não foi observada correlação entre p53 e o desfecho. Foi confirmado que o antígeno CA9 é expresso na maioria dos indivíduos

com câncer oral, sugerindo a possibilidade de imunoterapia dirigida ao antígeno CA9 neste tipo de câncer (KONDO et al., 2011).

Motta et al. (2009) correlacionaram a expressão imunoistoquímica de p53 e Ki67 nos carcinomas de células escamosas oral e de língua (28 casos) com o estado linfonodal, sexo, grau histológico, volume tumoral e estadiamento clínico. A p53 analisada individualmente mostrou significância estatística quando comparado com o volume tumoral. Apesar de uma forte tendência, a relação de p53 com estado linfonodal não foi significativa. Quando p53 + Ki67 foi analisado e associado com o volume tumoral, foi observada significância. A literatura mostra que a expressão dos marcadores p53 e Ki67 está relacionada com presença de metástases para linfonodos e pior prognóstico. Nos carcinomas de células escamosas de cavidade oral, o p53 e o Ki67 estão relacionados a tumores de maior tamanho, metástase positiva para linfonodos e possivelmente com pior prognóstico.

Outro aspecto que merece ser ressaltado é a definição das margens cirúrgicas pelo Ki67, pois demonstram a invasão tumoral por vezes não detectadas à microscopia óptica, sendo o aumento de sua positividade determinante de índices de pior prognóstico. Vale ressaltar que a positividade do Ki67 não é exclusiva das neoplasias malignas mas sim predominante em relação às benignas. Nos tecidos glandulares, por exemplo, é o melhor marcador de transformação maligna em carcinoma ex adenoma pleomórfico. Finalmente, foi salientada a positividade de Ki67 em carcinomas glandulares pós-irradiação como marcadores de recidiva, sendo tanto maior quanto a malignidade da neoplasia (BARBOSA et al., 2003).

---

*Proposição*

---

### **3 PROPOSIÇÃO**

Sabendo-se da importância que as proteínas de reparo do DNA e proteínas relacionadas ao ciclo celular apresentam em diversas condições, tanto fisiológicas quanto patológicas, a proposição da seguinte pesquisa é avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas APE1, XRCC1, p53 e Ki67 em uma série de casos de carcinomas de células escamosas de língua oral, correlacionando-os entre si e com parâmetros clínicos e histopatológicos prognósticos dessas lesões.

---

## *Materiais e Métodos*

---



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer (CEP/LNRCC) com parecer número 838.556 (anexo 1).

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi caracterizado como uma avaliação observacional, retrospectivo, com corte transversal, analítico e quantitativo da expressão das proteínas APE1, XRCC1, p53 e ki67 através de técnica imunoistoquímica em casos de CCELO.

### 4.3 POPULAÇÃO

A população de CCELO foi constituída pelos casos diagnosticados e arquivados entre 2000 a 2010 no serviço de Anatomia Patológica da Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer.

### 4.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi intencional e não probabilística, compreendendo todos os casos de CCEs de língua que se adequaram aos critérios de inclusão estabelecidos, perfazendo o total de 58 casos selecionados.

#### 4.4.1 Critérios de inclusão da amostra

- CCEOs localizados nos 2/3 anteriores da língua (língua oral);
- Casos de CCEs de língua oral provenientes de ressecção cirúrgica, os quais possibilitaram a avaliação do *front* de invasão tumoral;
- Casos cujos blocos em parafina apresentaram quantidade suficiente de material para realização do estudo imunoistoquímico;

- Casos em que seus prontuários apresentaram todos os dados necessários para a realização do estudo clínico.
- Casos que possuíam registro de 5 anos de acompanhamento para fins de análise do desfecho.

#### **4.4.2 Critérios de exclusão da amostra**

Foram excluídos da amostra casos localizados em terço posterior de língua, já que esses se encaixam na categoria de CCE de orofaringe.

#### **4.5 ESTUDO CLÍNICO E MORFOLÓGICO**

A partir dos prontuários dos pacientes foram obtidas informações sobre as seguintes características clínicas: sexo, idade, data de início do tratamento, tipo de tratamento recebido, estadiamento clínico, presença de metástase linfonodal, metástase à distância, recidiva e desfecho. Ressalta-se que a coleta dos dados clínicos foi realizada com auxílio de ficha elaborada para essa pesquisa (APÊNDICE A).

Dos espécimes de CCELOs selecionados, emblocados em parafina, foram obtidas lâminas histológicas para averiguação da quantidade de tecido lesional remanescente e análise morfológica. Cortes de 5µm de espessura foram realizados e corados pela técnica da Hematoxilina/Eosina (H/E). As lâminas foram escaneadas (3D HISTECH) e dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da gradação histopatológica de malignidade dos espécimes, no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005) (Quadro 2).

**Quadro 2** – Avaliação histopatológica de risco proposta por Brandwein-Gensler et al., (2005).

<b>Avaliação Histopatológica de Risco</b>			
<b>Variável Histopatológica</b>	<b>Valores atribuídos</b>		
	0	1	3
Invasão perineural	Nenhum	Pequenos nervos	Grandes nervos (>1mm)
Infiltrado inflamatório	Contínuo	Grandes agregados	Nenhum
Pior padrão de invasão	1 – “Pushing border” (contínuo) 2 – “Finger-like” (Projeções digitiformes) 3 – Grandes ilhas, com mais de 15 células	4 – Pequenas ilhas tumorais, com menos de 15 células em cada	5 – Ilhas satélites, com >1mm de distância do fronte de invasão tumoral.
<b>Pontuação de risco (soma dos pontos)</b>	<b>Risco de recorrência local</b>	<b>Probabilidade de sobrevida total</b>	<b>Indicação para radioterapia adjuvante</b>
0	Baixo	Boa	Não
1 ou 2	Intermediário	Intermediária	Não
3 a 9	Alto	Pobre	Sempre

Fonte: Adaptado de Brandwein-Gensler et al. (2005).

## 4.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

### 4.6.1 Método imunoistoquímico

Os ensaios imunoistoquímicos foram realizados em cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas, previamente limpas, desengorduradas e posteriormente silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA), seguindo-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase padrão. Os anticorpos primários utilizados e suas respectivas diluições estão dispostas no quadro 3. As lâminas foram incubadas em estufa a 70°C por 3 horas e após este período foram desparafinizadas em xilol e gradiente de álcool. Foi realizada a recuperação antigênica com citrato pH 6,0 em panela Pascal. Após bloqueio da atividade endógena da peroxidase (solução aquosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10V), foram incubados os anticorpos primários (diluição e tempo de incubação conforme recomendações do fabricante) a 4°C em câmara úmida. Foi adicionado o anticorpo secundário biotilado seguido do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, sendo

revelado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma Co., S. Louis, EUA) tendo o peróxido de hidrogênio como substrato. Após a revelação, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harrys. Como controle positivo foi utilizado carcinoma ductal de mama para APE1, XRCC1, p53 e tecido de amígdala para Ki67. Como controle negativo foi omitido o anticorpo primário para todas as reações.

**Quadro 3** – Anticorpos utilizados para a reação de imunoistoquímica.

Anticorpo	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação	Fabricante
Anti-APE1	Ab3722	Trilogy, Pascal 121°C, 30 minutos	1:500	Overnight	ABCAM
Anti-XRCC1	33-2-5	Trilogy, Pascal 121°C, 30 minutos	1:2000*	Overnight*	Lab Vision
Anti-p53	DO-7	Trilogy, Pascal, 121°C, 30 minutos	1:200	60 min	DAKO Corporation
Anti-Ki67	MIB-1	Trilogy; Pascal, 121°C, 30 minutos	1:200	60 min.	DAKO Corporation

Fonte: Projeto de pesquisa.

#### 4.6.2 Análise imunoistoquímica

Para o APE1 e XRCC1 o procedimento de análise foi feito de forma semi-quantitativa, por dois observadores, em dias diferentes, utilizando-se microscópio óptico. A análise da marcação imunoistoquímica foi realizada de forma global em toda extensão do *front* de invasão tumoral.

Foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no núcleo e citoplasma, independente da intensidade de marcação.

A análise semi-quantitativa para o APE1 e XRCC1 foi adaptada da metodologia proposta por Hsia et al. (2015) e Mahjabeen et al. (2014). As células do *front* de invasão tumoral foram avaliadas em microscopia de luz com magnificação de 200X e 400X e os casos classificados em: escore 1 (0-10% de células imunomarcadas), escore 2 (11-50% de células imunomarcadas) e escore 3 (> 50% de células imunomarcadas). Para análise estatística, as células que apresentaram escorem 1 e 2 foram agrupadas na categoria baixa expressão (≤50% de células

imunomarcadas) e as que apresentaram >50% de células imunomarcadas, na categoria alta imunoexpressão.

Para p53 e ki67 o procedimento de análise foi feito de forma quantitativa, utilizando-se microscópio de luz para obtenção de fotos e contagem através do uso do *software* para processamento e análise de imagens Image J®. Foi considerada positiva a coloração nuclear acastanhada, independentemente da intensidade da coloração. Foram realizadas fotos sequenciais do *front* de invasão tumoral na ampliação de 400x e procedeu-se a contagem. Nos espécimes positivos, os índices de marcação foram calculados de acordo com metodologia adaptada de Kumar, Kane e Rathod (2012) por contagem manual de células na área do *front* de invasão até perfazer o total de 1000 células contadas, estabelecendo o percentual de células positivas presente nesta quantidade. Após contagem os casos foram classificados de acordo com metodologia adaptada de Motta et al. (2009) em baixa expressão (0 a 50% de células imunomarcadas) e alta expressão ( $\leq$  50% de células imunomarcadas).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, realizou-se a análise estatística descritiva objetivando caracterizar a amostra. Foram calculadas as frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas, bem como as medidas de tendência central e de variabilidade para as variáveis quantitativas. Em seguida, para determinar associação entre a imunoexpressão das proteínas APE1, XRCC1, p53 e Ki67, parâmetros clínicos prognósticos e gradação histológica de malignidade dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral empregou-se o teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado (LARSON; FARBER, 2016). O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas usando o software IBM SPSS, versão 20.0, e considerando um intervalo de confiança de 95%.

---

---

*Resultados*

---

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 58 casos de carcinoma de células escamosas de língua oral para compor a amostra desta pesquisa, diagnosticados entre janeiro de 2001 e dezembro de 2010, nos hospitais da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer – Natal/RN. Durante esse período, foram diagnosticados 282 casos de CCE de língua oral, dos quais 138 (47,16%) foram tratados por ressecção cirúrgica do tumor. Obedecendo aos critérios de inclusão estabelecidos para este estudo, foram eliminados os casos nos quais o material biológico armazenado em blocos de parafina era insuficiente para análise (n=8) e também aqueles cujos blocos não foram encontrados no arquivo (n=56). Foram incluídos apenas os casos que possuíam registro de cinco anos de seguimento ou registro de óbito, para fins de análise do desfecho.

Do total de casos avaliados neste estudo, verificou-se que a maioria era do sexo masculino (n = 39; 67,2%), possuía 60 anos ou mais (n = 35; 60,3%), apresentava histórico de alcoolismo (n = 33; 68,8%) e tabagismo (n = 45; 86,5%). Mais da metade dos casos era de tumor em estágio avançado (n = 30; 52,6%), submetidos a tratamento cirúrgico associado a outras modalidades (radioterapia e/ou quimioterapia) (n = 43; 74,1%).

Um total de 19 pessoas (32,8%) apresentaram recidiva local em até 2 anos e a maioria dos casos não apresentaram metástase linfonodal com comprovação de biópsia (n = 32, 55,2%). Apenas 26 casos apresentaram dados sobre etapa do diagnóstico do comprometimento linfonodal, sendo 24 destes (41,4%) já apresentando comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico e apenas 2 (3,4%) durante o tratamento. Sobre o desfecho, 21 pessoas vieram a óbito (36,2%), conforme pode ser observado na Tabela 1 de caracterização da amostra.

**Tabela 1** – Distribuição dos casos de acordo com as características sócio-demográficas e clínicas.

Variáveis	n	%
<b>Gênero [58]</b>		
Masculino	39	67,2
Feminino	19	32,8
<b>Grupo etário [58]</b>		
Até 59 anos	23	39,7
60 anos ou mais	35	60,3
<b>Alcoolismo [48]</b>		
Não	15	31,3
Sim	33	68,8
<b>Tabagismo [52]</b>		
Não	7	13,5
Sim	45	86,5
<b>Estado da doença [58]</b>		
Sem sinal	30	51,7
Óbito	21	36,2
Estável/progressão	7	12,1
<b>Estadiamento clínico TNM [57]</b>		
Inicial (estágios I ou II)	27	47,4
Avançado (estágios III ou IV)	30	52,6
<b>Presença de recidiva local em até 2 anos [58]</b>		
Não	39	67,2
Sim	19	32,8
<b>Metástase linfonodal com comprovação de biópsia [58]</b>		
Não	32	55,2
Sim	26	44,8
<b>Etapas do diagnóstico do comprometimento linfonodal [26]</b>		
No diagnóstico	24	41,4
Durante o tratamento	2	3,4
<b>Presença de metástase à distância [58]</b>		
Não	54	93,1
Sim	4	6,9
<b>Tratamento [58]</b>		
Apenas cirurgia	15	25,9
Cirurgia e outros	43	74,1

Fonte: Autora, 2018.

*Nota.* Os valores entre [ ] indicam o total de casos válidos para cada variável.

## 5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para a gradação histopatológica de todos os casos utilizou-se o modelo de análise de risco proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005). Verificou-se que em 37 casos (63,79%) houve invasão perineural em nervos pequenos (<1mm) (Figura 6). O infiltrado inflamatório mostrou-se contínuo na maioria dos casos (n = 32, 55,1%) (Figura 7). O pior padrão de invasão predominante foi o tipo 4 (no qual as células invadem em ninhos com menos de 15 células),



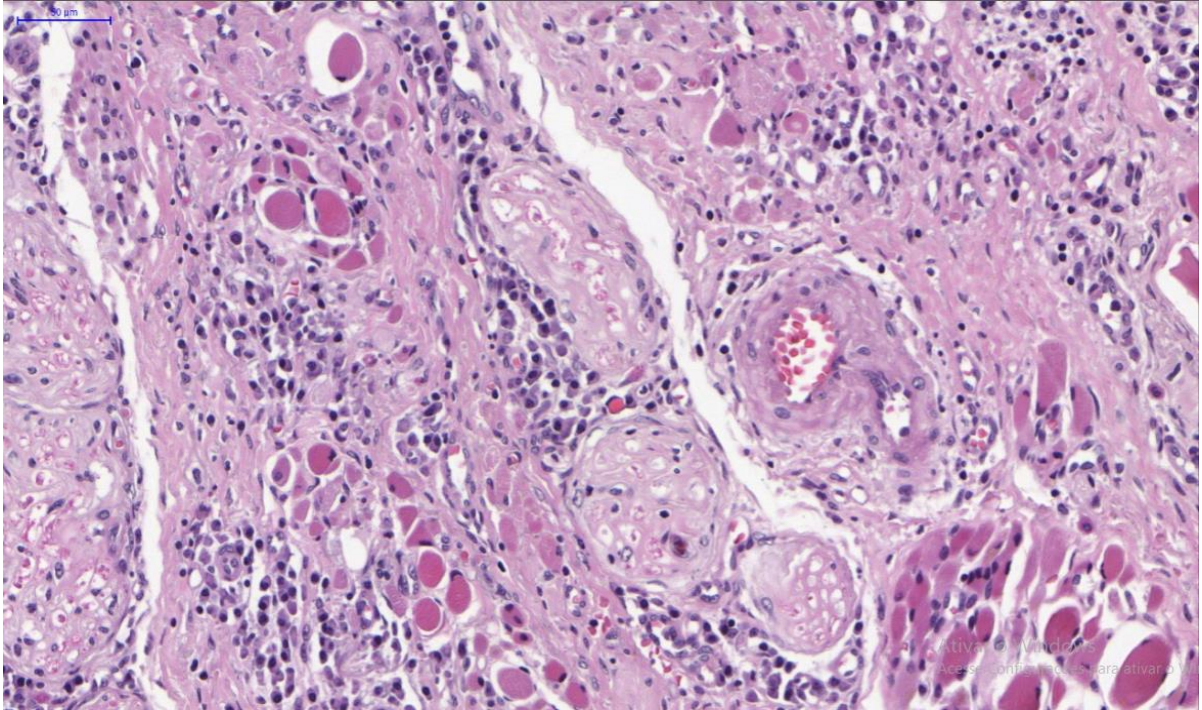
compreendendo 46 casos (79,3%) (Figura 8). Ao final da análise de risco, observou-se predominância dos casos pertencentes ao grupo de risco intermediário (n= 33, 56,8%) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Distribuição absoluta e relativa dos parâmetros de análise histopatológica dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral segundo proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005).

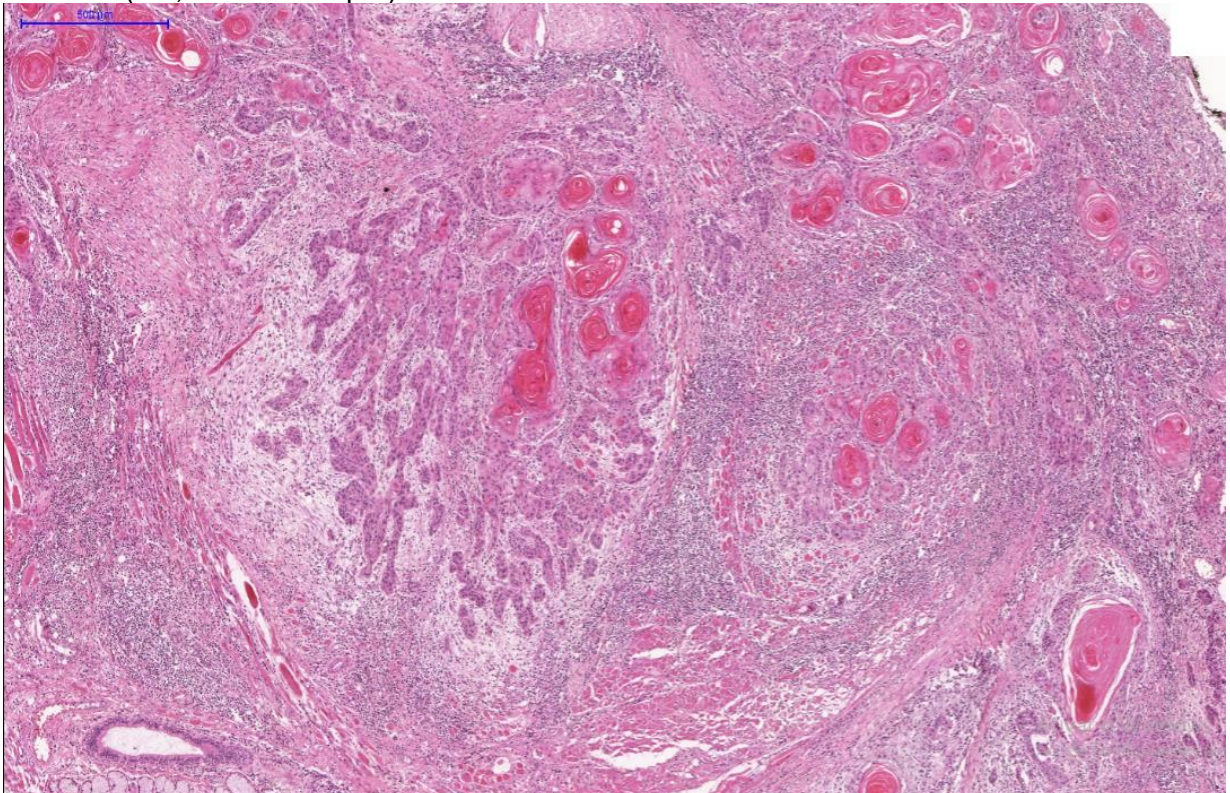
PARÂMETRO	N	%
<b>INVASÃO PERINEURAL</b>		
NÃO HÁ	21	36,2
EM NERVOS PEQUENOS	37	63,7
<b>INFILTRADO LIFOCÍTICO</b>		
CONTÍNUO	32	55,1
EM PLACAS	15	25,8
POUCO OU NENHUM	11	18,9
<b>PIOR PADRÃO DE INVASÃO</b>		
PADRÃO 1,2 OU 3	9	15,51
PADRÃO 4	46	79,3
PADRÃO 5	3	6,5
<b>GRADAÇÃO FINAL PELO SISTEMA DE BRANDWEIN-GENSLER</b>		
BAIXO RISCO	4	6,8
RISCO INTERMEDIÁRIO	33	56,8
ALTO RISCO	21	36,2
<b>TOTAL</b>	<b>58</b>	<b>100</b>

Fonte: Autora, 2018.

**Figura 6** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo invasão perineural em pequeno fascículo nervoso (HE; Barra = 50µm).

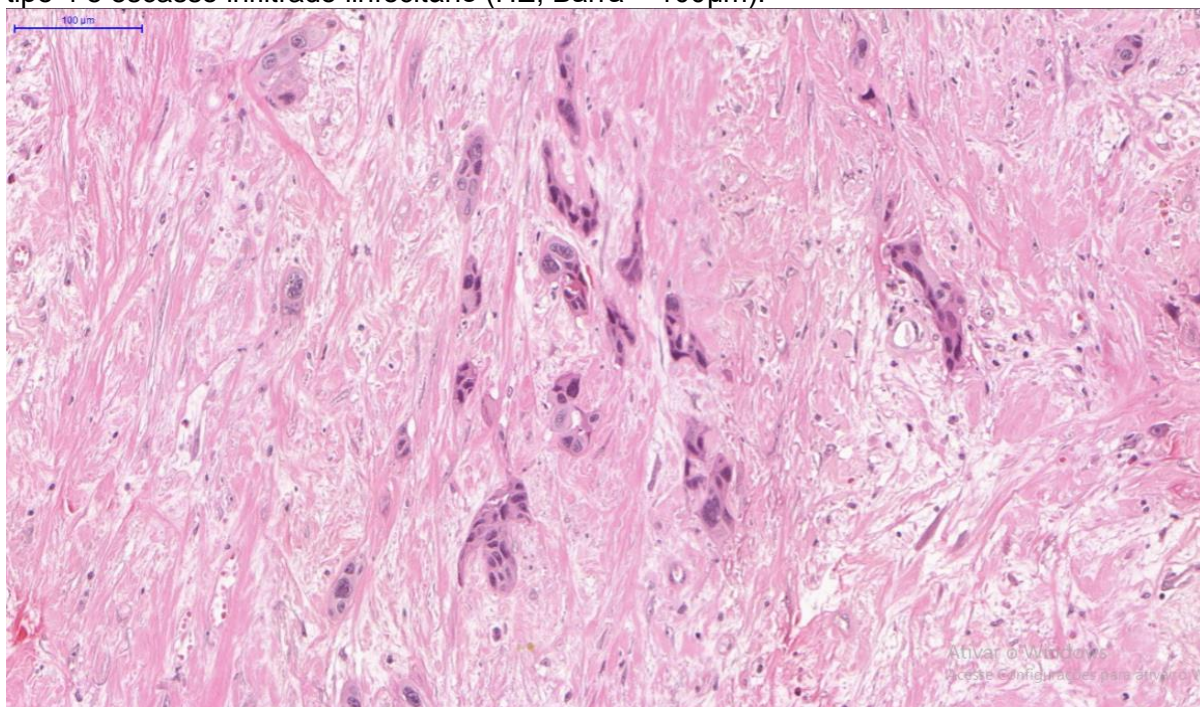


**Figura 7** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo infiltrado linfocitário contínuo (HE; Barra = 500µm).





**Figura 8** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo pior padrão de invasão tipo 4 e escasso infiltrado linfocitário (HE; Barra = 100µm).



### 5.3 RESULTADO DA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Na tabela 3, observa-se que a maioria dos casos apresentou alta imunoexpressão para APE1 (n = 36; 62,1%), assim como para XRCC1 (n = 38; 65,5%). Já para Ki67 e p53, houve uma distribuição igual quando os casos foram categorizados em baixa e alta expressão (n = 29, 50%).

As figuras de 9 a 16 mostram o padrão de marcação para cada imunomarcador utilizado neste estudo.

**Tabela 3** – Distribuição dos casos de acordo com as características imunoistoquímicas.

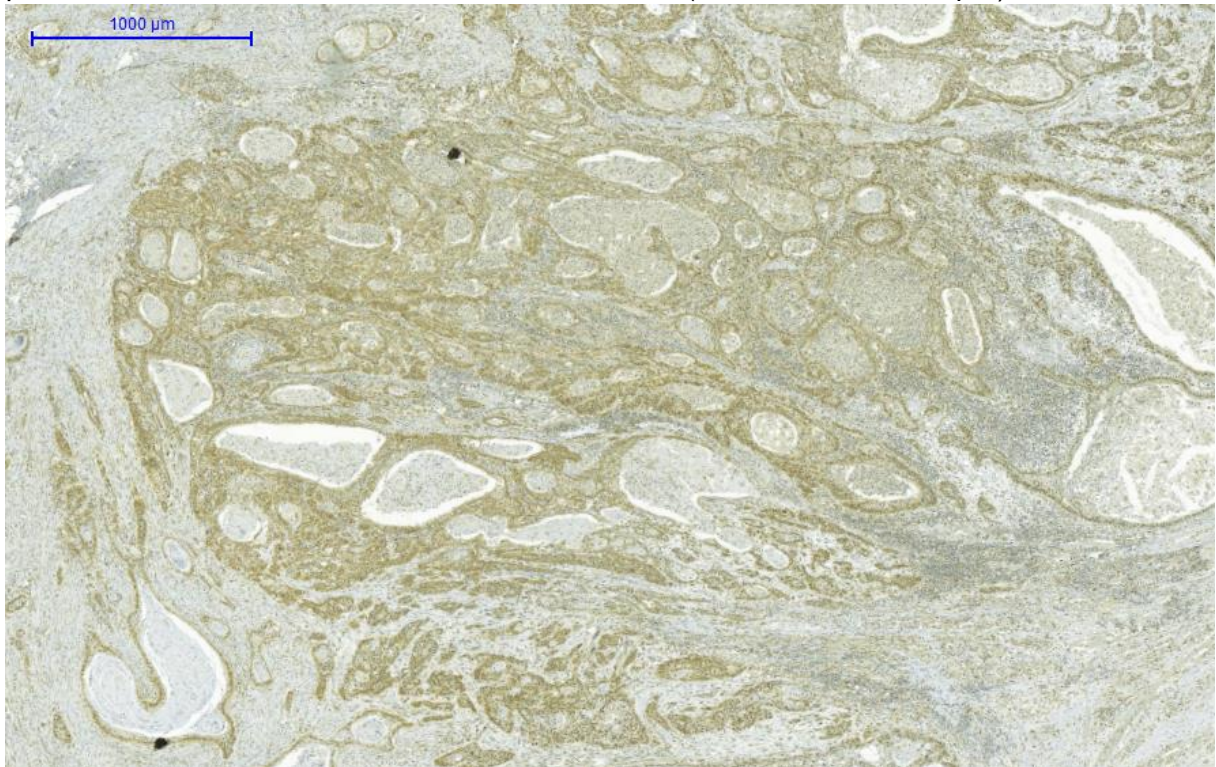
Variáveis	n	%
<b>Imunoexpressão de de APE1 [58]</b>		
Baixa	22	37,9
Alta	36	62,1
<b>Imunoexpressão de XRCC1 [58]</b>		
Baixo	20	34,5
Alto	38	65,5
<b>Imunoexpressão de Ki 67 [58]</b>		
Baixo	29	50,0
Alto	29	50,0
<b>Imunoexpressão de p53 [58]</b>		
Baixo	29	50,0
Alto	29	50,0

Fonte: Autora, 2018.

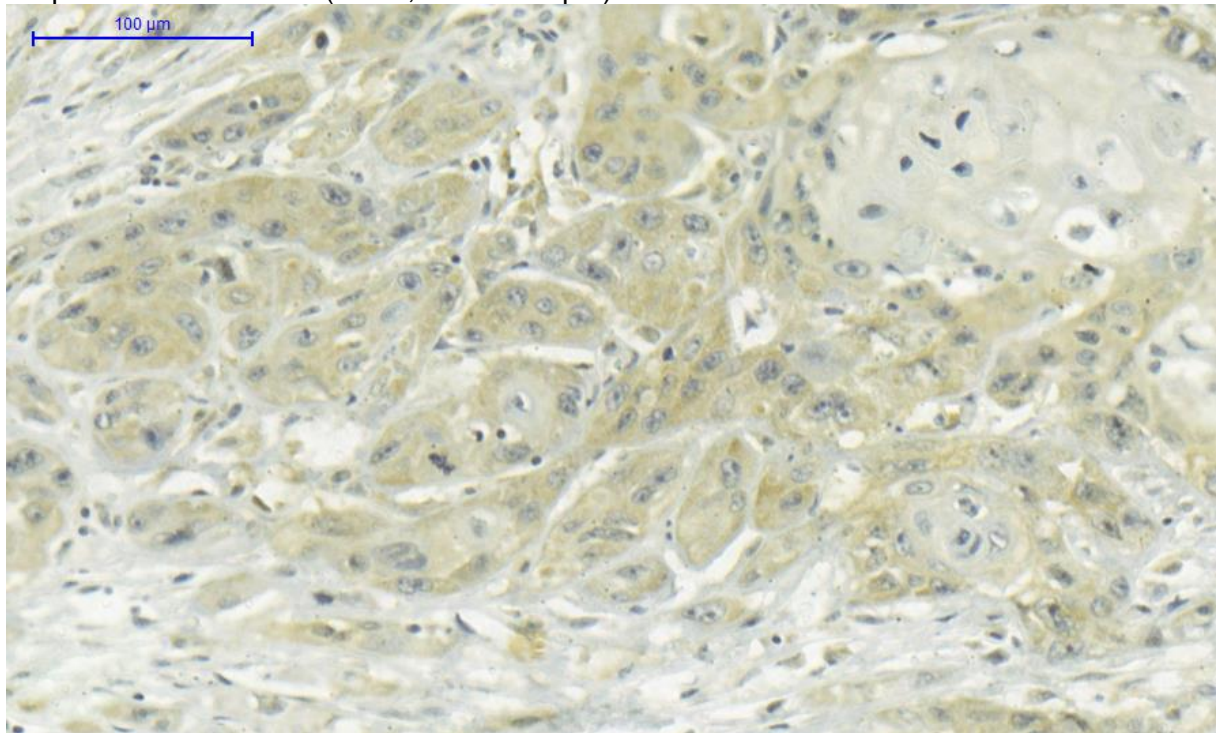
*Nota.* Os valores entre [ ] indicam o total de casos válidos para cada variável.



**Figura 9** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoexpressão positiva de APE1 >50% no *front* de invasão tumoral (HiDef; Barra = 1000µm).

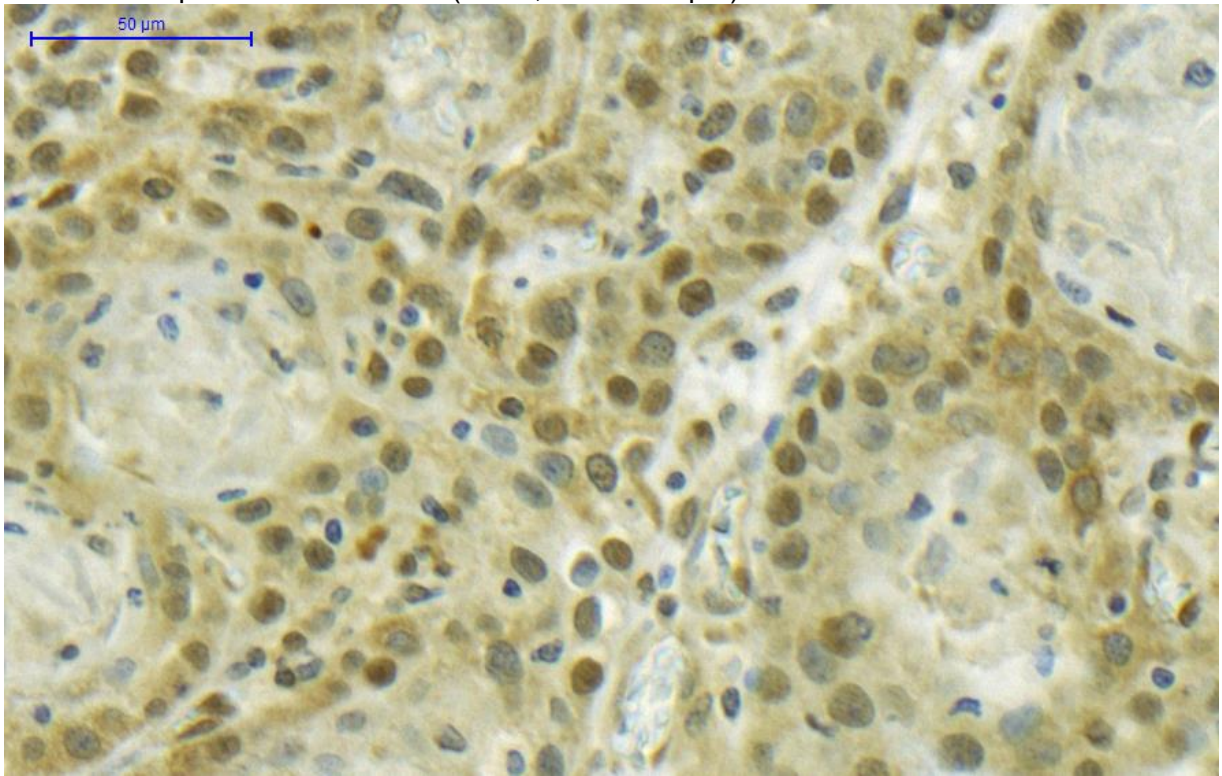


**Figura 10** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoexpressão citoplasmática de APE1 (HiDef; Barra=100µm).

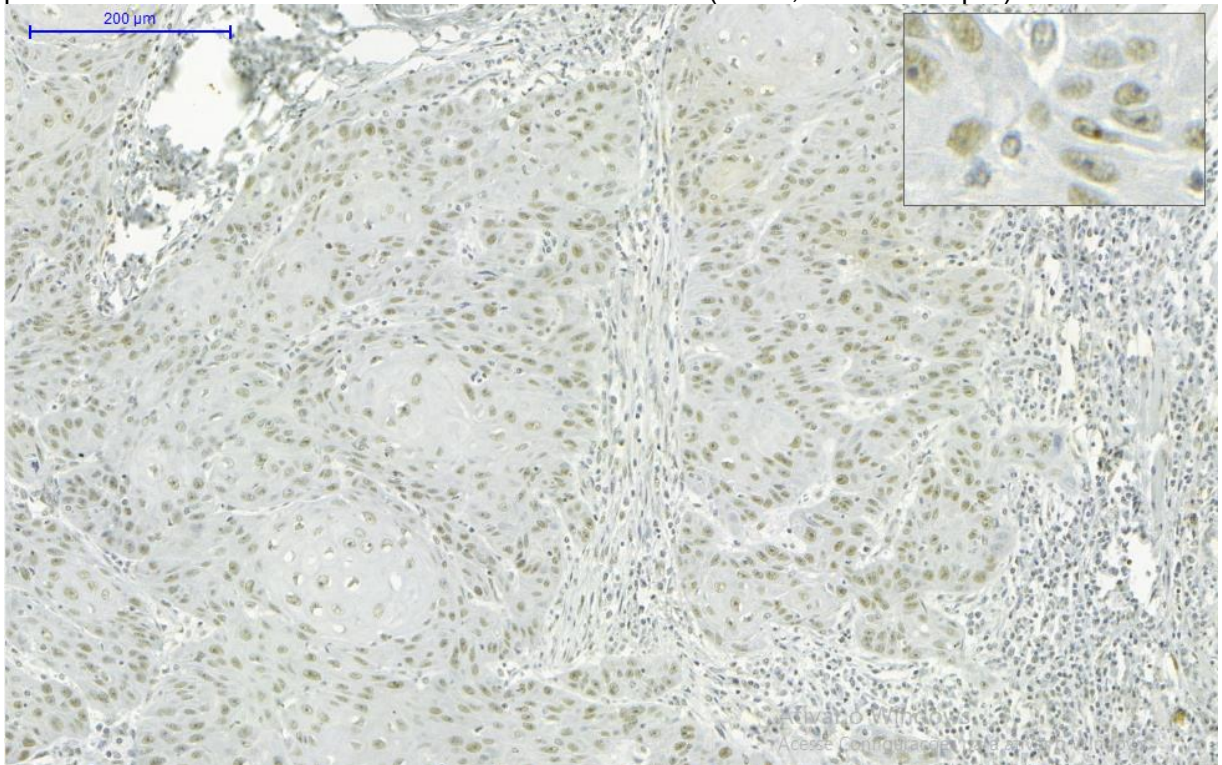




**Figura 11** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoexpressão nuclear e citoplasmática de APE1 (HiDef; Barra = 50µm).

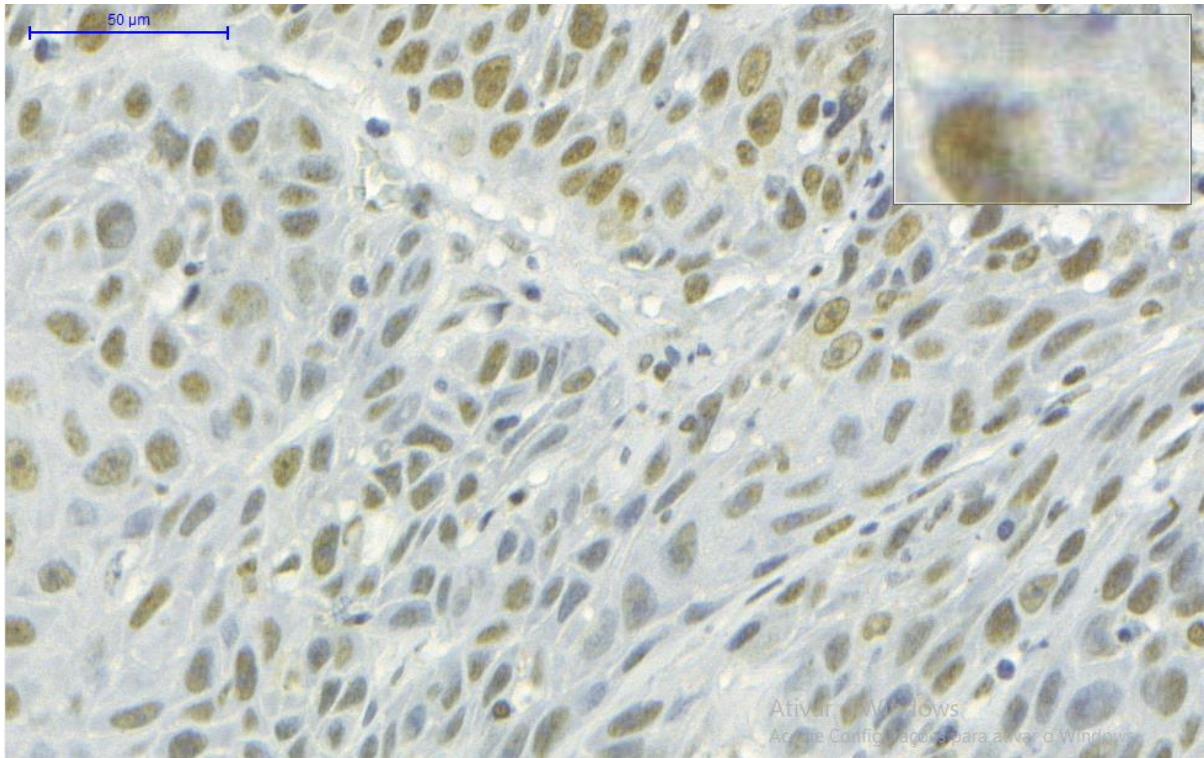


**Figura 12** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo imunoexpressão positiva de XRCC1 >50% no *front* de invasão tumoral (HiDef; Barra = 200µm).

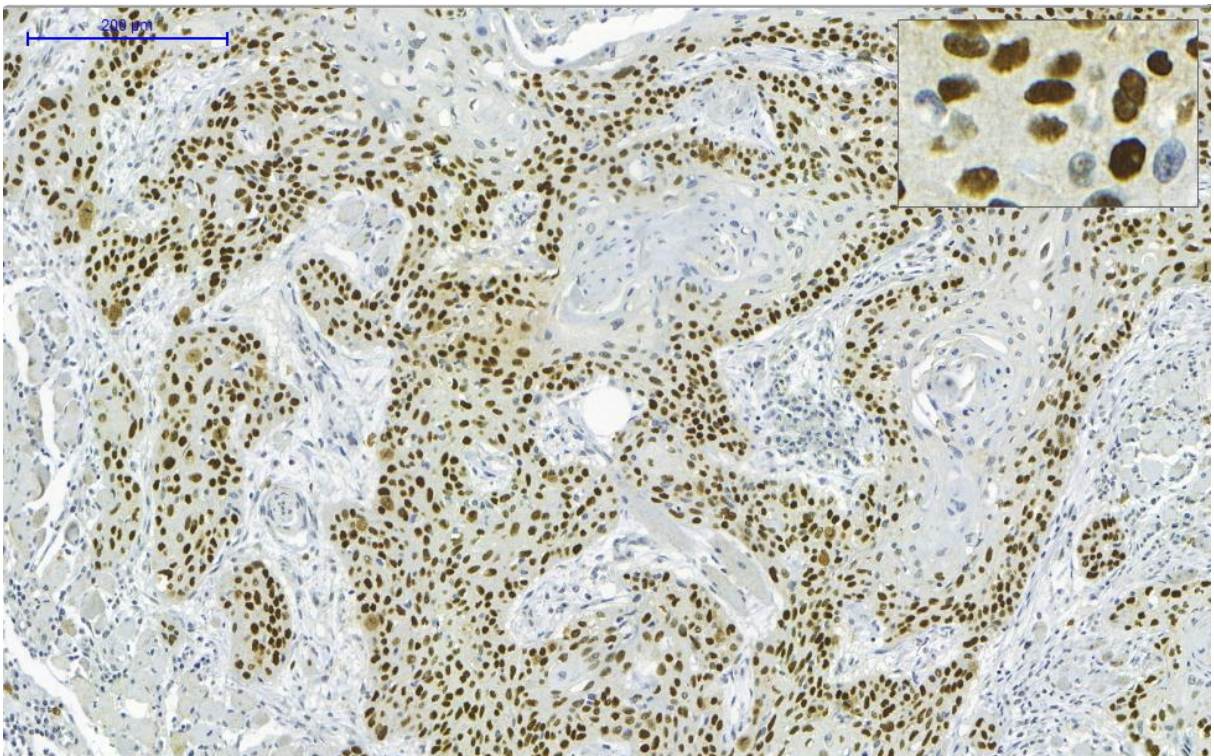




**Figura 13** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoexpressão de XRCC1 (HiDef; Barra = 50µm).

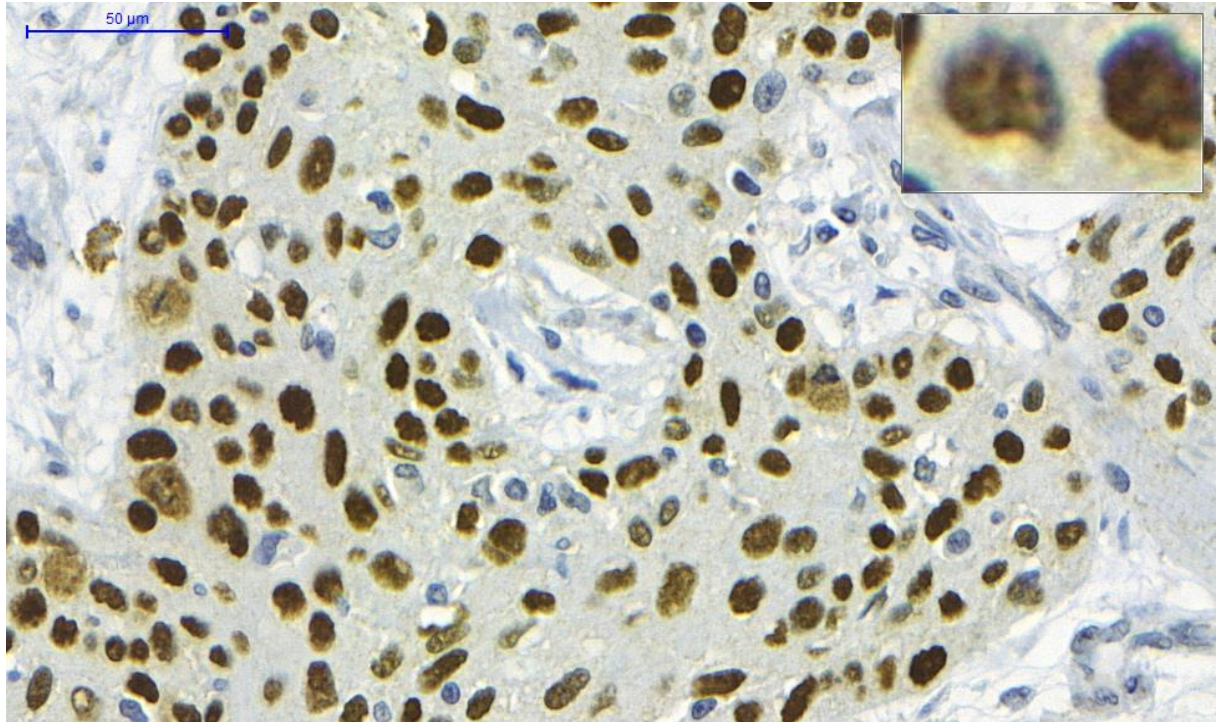


**Figura 14** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoexpressão de p53 no *front* de invasão tumoral (HiDef; Barra = 200µm).

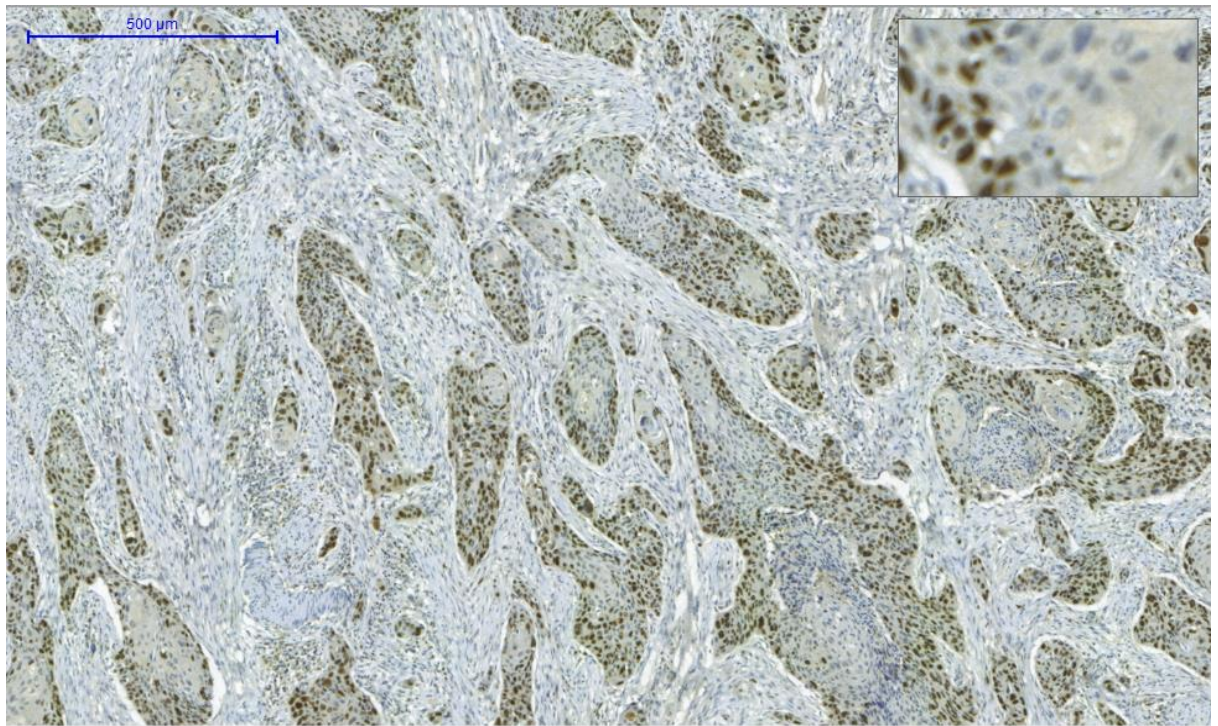




**Figura 15** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoexpressão de p53 (HiDef; Barra = 50µm).



**Figura 16** – Carcinoma de células escamosas de língua oral exibindo alta imunoexpressão de ki67 no *front* de invasão tumoral (HiDef; Barra = 500µm).



## 5.4 RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 mostram os resultados da comparação dos níveis de imunexpressão das proteínas APE1, XRCC1, p53 e Ki67 entre si, com os parâmetros clínicos prognósticos e gradação histológica de malignidade dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral.

Não se constatou associação estatisticamente significativa entre a imunexpressão de APE1, XRCC1, p53 e Ki67, assim como entre essas e os parâmetros clínicos e a gradação histológica de malignidade dos tumores (p-valores > 0,05).

Também não se verificou associação estatisticamente significativa entre a imunexpressão das proteínas APE1 e XRCC1 com as proteínas p53 e Ki67 em carcinoma de células escamosas de língua oral (p-valores > 0,05). Por outro lado, associação estatisticamente significativa foi observada entre o estadiamento clínico do tumor e a imunexpressão de p53 ( $p = 0,047$ ) e XRCC1 ( $p = 0,005$ ). A imunexpressão de XRCC1 foi significativamente maior (alta) nos casos de lesão em estágio inicial I e II ( $n = 23$ ; 62,2%) e baixa em estágios avançados III e IV ( $n=16$ , 80%) e a imunexpressão de p53 foi significativamente maior nos casos de lesão em estágio avançado ( $n = 19$ ; 65,5%) e baixa em estágios iniciais ( $n=17$ , 60,7%).

Por fim, não se verificou associação estatisticamente significativa entre a presença de metástase linfonodal nos carcinomas de células escamosas de língua oral e a gradação histológica de malignidade dos tumores ( $p = 0,215$ ) (Tabela 8).

**Tabela 4** – Comparação do nível de imunexpressão de APE1 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunexpressão de outras proteínas.

Variável	Imunexpressão de APE1			p-valor
	Baixa n (%)	Alta n (%)	Total n (%)	
<b>Presença de recidiva local em até 2 anos</b>				0,647 <sup>(a)</sup>
Não	14 (63,6)	25 (69,4)	39 (67,2)	
Sim	8 (36,4)	11 (30,6)	19 (32,8)	
<b>Presença de metástase linfonodal com comprovação de biópsia</b>				0,311 <sup>(a)</sup>
Não	14 (63,6)	18 (50,0)	32 (55,2)	
Sim	8 (36,4)	18 (50,0)	26 (44,8)	
<b>Presença de metástase a distância</b>				0,630 <sup>(b)</sup>
Não	20 (90,9)	34 (94,4)	54 (93,1)	



Sim	2 (9,1)	2 (5,6)	4 (6,9)	
<b>Gradação histopatológica de malignidade</b>				0,999 <sup>(b)</sup>
Baixo risco	1 (4,5)	3 (8,3)	4 (6,9)	
Risco intermediário	13 (59,1)	20 (55,6)	33 (56,9)	
Alto risco	8 (36,4)	13 (36,1)	21 (36,2)	
<b>Estadiamento clínico TNM</b>				0,390 <sup>(a)</sup>
Inicial (estágios I ou II)	12 (54,5)	15 (42,9)	27 (47,4)	
Avançado (estágios III ou IV)	10 (45,5)	20 (57,1)	30 (52,6)	
<b>Imunoexpressão de Ki 67</b>				0,588 <sup>(a)</sup>
Baixa	12 (54,5)	17 (47,2)	29 (50,0)	
Alta	10 (45,5)	19 (52,8)	29 (50,0)	
<b>Imunoexpressão de p53</b>				0,279 <sup>(a)</sup>
Baixa	13 (59,1)	16 (44,4)	29 (50,0)	
Alta	9 (40,9)	20 (55,6)	29 (50,0)	
<b>Imunoexpressão de XRCC1</b>				0,999 <sup>(b)</sup>
Baixa	8 (36,4)	12 (33,3)	20 (34,5)	
Alta	14 (63,6)	24 (66,7)	38 (65,5)	
<b>Estado da doença</b>				0,516 <sup>(b)</sup>
Sem sinal	10 (45,5)	20 (55,6)	30 (51,7)	
Óbito	8 (36,4)	13 (36,1)	21 (36,2)	
Estável/progressão	4 (18,2)	3 (8,3)	7 (12,1)	

Fonte: Autora, 2018.

Nota. <sup>(a)</sup> Teste qui-quadrado de Pearson; <sup>(b)</sup> Teste exato de Fisher.

**Tabela 5** – Comparação do nível de imunoexpressão de XRCC1 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunoexpressão de outras proteínas.

Variável	Imunoexpressão de XRCC1			p-valor
	Baixa	Alta	Total	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>Presença de recidiva local em até 2 anos</b>				0,361 <sup>(a)</sup>
Não	15 (75,0)	24 (63,2)	39 (67,2)	
Sim	5 (25,0)	14 (36,8)	19 (32,8)	
<b>Presença de metástase linfonodal com comprovação de biópsia</b>				0,092 <sup>(a)</sup>
Não	8 (40,0)	24 (63,2)	32 (55,2)	
Sim	12 (60,0)	14 (36,8)	26 (44,8)	
<b>Presença de metástase a distância</b>				0,999 <sup>(b)</sup>
Não	19 (95,0)	35 (92,1)	54 (93,1)	
Sim	1 (5,0)	3 (7,9)	4 (6,9)	
<b>Gradação histopatológica de malignidade</b>				0,389 <sup>(b)</sup>
Baixo risco	0 (0,0)	4 (10,5)	4 (6,9)	
Risco intermediário	13 (65,0)	20 (52,6)	33 (56,9)	
Alto risco	7 (35,0)	14 (36,8)	21 (36,2)	
<b>Estadiamento clínico TNM</b>				<b>0,005 <sup>(b)*</sup></b>
Inicial (estágios I ou II)	4 (20,0)	23 (62,2)	27 (47,4)	
Avançado (estágios III ou IV)	16 (80,0)	14 (37,8)	30 (52,6)	
<b>Imunoexpressão de Ki 67</b>				1,000 <sup>(a)</sup>

Baixa	10 (50,0)	19 (50,0)	29 (50,0)	0,097 <sup>(a)</sup>
Alta	10 (50,0)	19 (50,0)	29 (50,0)	
<b>Imunoexpressão de p53</b>				
Baixa	7 (35,0)	22 (57,9)	29 (50,0)	0,499 <sup>(b)</sup>
Alta	13 (65,0)	16 (42,1)	29 (50,0)	
<b>Estado da doença</b>				
Sem sinal	10 (50,0)	20 (52,6)	30 (51,7)	0,499 <sup>(b)</sup>
Óbito	9 (45,0)	12 (31,6)	21 (36,2)	
Estável/progressão	1 (5,0)	6 (15,8)	7 (12,1)	

Fonte: Autora, 2018.

Nota. <sup>(a)</sup> Teste qui-quadrado de Pearson; <sup>(b)</sup> Teste exato de Fisher; \* p < 0,05.

**Tabela 6** – Comparação do nível de imunoexpressão de Ki67 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunoexpressão de outras proteínas.

Variável	Imunoexpressão de Ki67			p-valor
	Baixa n (%)	Alta n (%)	Total n (%)	
<b>Presença de recidiva local em até 2 anos</b>				0,780 <sup>(a)</sup>
Não	20 (69,0)	19 (65,5)	39 (67,2)	0,291 <sup>(a)</sup>
Sim	9 (31,0)	10 (34,5)	19 (32,8)	
<b>Presença de metástase linfonodal com comprovação de biópsia</b>				0,291 <sup>(a)</sup>
Não	14 (48,3)	18 (62,1)	32 (55,2)	1,000 <sup>(b)</sup>
Sim	15 (51,7)	11 (37,9)	26 (44,8)	
<b>Presença de metástase a distância</b>				1,000 <sup>(b)</sup>
Não	27 (93,1)	27 (93,1)	54 (93,1)	0,080 <sup>(b)</sup>
Sim	2 (6,9)	2 (6,9)	4 (6,9)	
<b>Gradação histopatológica de malignidade</b>				0,080 <sup>(b)</sup>
Baixo risco	0 (0,0)	4 (13,8)	4 (6,9)	0,066 <sup>(a)</sup>
Risco intermediário	16 (55,2)	17 (58,6)	33 (56,9)	
Alto risco	13 (44,8)	8 (27,6)	21 (36,2)	
<b>Imunoexpressão de p53</b>				0,066 <sup>(a)</sup>
Baixa	18 (62,1)	11 (37,9)	29 (50,0)	0,083 <sup>(a)</sup>
Alta	11 (37,9)	18 (62,1)	29 (50,0)	
<b>Estadiamento clínico TNM</b>				0,083 <sup>(a)</sup>
Inicial (estágios I ou II)	10 (35,7)	17 (58,6)	27 (47,4)	0,279 <sup>(b)</sup>
Avançado (estágios III ou IV)	18 (64,3)	12 (41,4)	30 (52,6)	
<b>Estado da doença</b>				0,279 <sup>(b)</sup>
Sem sinal	12 (41,4)	18 (62,1)	30 (51,7)	0,279 <sup>(b)</sup>
Óbito	13 (44,8)	8 (27,6)	21 (36,2)	
Estável/progressão	4 (13,8)	3 (10,3)	7 (12,1)	

Fonte: Autora, 2018.

Nota. <sup>(a)</sup> Teste qui-quadrado de Pearson; <sup>(b)</sup> Teste exato de Fisher.

**Tabela 7** – Comparação do nível de imunexpressão de p53 de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de carcinoma de células escamosas de língua oral, gradação histopatológica de malignidade, estágio clínico (TNM) e imunexpressão de outras proteínas.

Variável	Imunexpressão de p53			p-valor
	Baixa n (%)	Alta n (%)	Total n (%)	
<b>Presença de recidiva local em até 2 anos</b>				0,780 <sup>(a)</sup>
Não	20 (69,0)	19 (65,5)	39 (67,2)	
Sim	9 (31,0)	10 (34,5)	19 (32,8)	
<b>Presença de metástase linfonodal com comprovação de biópsia</b>				0,113 <sup>(a)</sup>
Não	19 (65,5)	13 (44,8)	32 (55,2)	
Sim	10 (34,5)	16 (55,2)	26 (44,8)	
<b>Presença de metástase a distância</b>				0,611 <sup>(b)</sup>
Não	26 (89,7)	28 (96,6)	54 (93,1)	
Sim	3 (10,3)	1 (3,4)	4 (6,9)	
<b>Gradação histopatológica de malignidade</b>				0,349 <sup>(b)</sup>
Baixo risco	1 (3,4)	3 (10,3)	4 (6,9)	
Risco intermediário	19 (65,5)	14 (48,3)	33 (56,9)	
Alto risco	9 (31,0)	12 (41,4)	21 (36,2)	
<b>Estadiamento clínico TNM</b>				<b>0,047 <sup>(a)*</sup></b>
Inicial (estágios I ou II)	17 (60,7)	10 (34,5)	27 (47,4)	
Avançado (estágios III ou IV)	11 (39,3)	19 (65,5)	30 (52,6)	
<b>Estado da doença</b>				0,572 <sup>(b)</sup>
Sem sinal	14 (48,3)	16 (55,2)	30 (51,7)	
Óbito	10 (34,5)	11 (37,9)	21 (36,2)	
Estável/progressão	5 (17,2)	2 (6,9)	7 (12,1)	

Fonte: Autora, 2018.

Nota. <sup>(a)</sup> Teste qui-quadrado de Pearson; <sup>(b)</sup> Teste exato de Fisher; \* p < 0,05.

**Tabela 8** – Comparação entre a ocorrência de metástase linfonodal com comprovação de biópsia e gradação histopatológica de malignidade.

Variável	Metástase linfonodal com comprovação de biópsia			p-valor
	Sim n (%)	Não n (%)	Total n (%)	
<b>Gradação histopatológica de malignidade</b>				0,215 <sup>(b)</sup>
Baixo risco	0 (0,0)	4 (12,5)	4 (6,9)	
Risco intermediário	16 (61,5)	17 (53,1)	33 (56,9)	
Alto risco	10 (38,5)	11 (34,4)	21 (36,2)	

Fonte: Autora, 2018.

Nota. <sup>(b)</sup> Teste exato de Fisher.

---

---

*Discussão*

---

---

## 6 DISCUSSÃO

Os avanços nas investigações das alterações moleculares que ocorrem nas células submetidas à transformação maligna ajudam a desvendar os mecanismos de ocorrência e progressão dos tumores. Neste sentido, a identificação de moléculas específicas associadas ao processo carcinogênico tem conduzido ao conhecimento de um crescente número de marcadores moleculares que demonstram relação com as características das neoplasias malignas, complementando os parâmetros clínicos e histológicos tradicionalmente utilizados. Assim, é possível identificar o grupo dos pacientes de alto risco, contribuindo para estimativas mais confiáveis sobre o prognóstico da doença e orientando as condutas terapêuticas (SCHLIEPHAKE, 2003). No sentido de ajudar a esclarecer ou identificar biomarcadores de prognóstico do CCEO, tem se destacado os genes de reparo de DNA, especulando-se que uma de suas funções seja influenciar no ciclo celular (QING et al., 2015).

Os genes de reparo do DNA e suas proteínas correspondentes estão envolvidos na correção de danos provocados por agentes carcinogênicos, como álcool, tabaco e radiação ultravioleta. Os mecanismos envolvidos no reparo do DNA são de interesse para as pesquisas com câncer pelo fato de que mutações nos genes de reparo podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de tumores e de resistência das células malignas a agentes quimioterápicos (KROKAN et al., 2000; ROBERTSON et al., 2009; ZHAO; USDIN, 2015).

Poucos estudos investigaram o papel da expressão de proteínas de reparo do DNA em associação com proteínas envolvidas com o ciclo celular na carcinogênese oral (MAHJABEEN et al., 2014). Este fato, associado ao papel determinante destas proteínas na tumorigênese humana, motivou essa pesquisa a analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo de DNA (APE1, XRCC1) e das proteínas envolvidas no ciclo celular (p53 e ki67), associando-as entre si e com parâmetros clínicos e histopatológicos em CCE de língua oral, uma vez que este é o sítio intraoral de maior acometimento e pior prognóstico, visando contribuir para o melhor entendimento da participação dessas proteínas no desenvolvimento desta neoplasia.

Histopatologicamente, os 58 casos de CCE de língua oral, caracterizavam-se por uma desordem proliferativa de células do epitélio de revestimento, que expressava graus variados de similaridade com suas células de origem. As células exibiam, por vezes, citoplasma bastante eosinofílico, núcleo vesiculoso de tamanho

aumentado com hipercromatismo, pontes intercelulares proeminentes, figuras de mitoses típicas ou atípicas, pleomorfismo celular, pleomorfismo nuclear e pérolas de ceratina. Estas células invadiram o tecido conjuntivo de forma isolada ou em grupos, formando cordões, ninhos e lençóis e havia possibilidade de avaliação do *front* de invasão tumoral. Observou-se, em alguns casos, invasão vascular, perineural e muscular, corroborando os achados clássicos encontrados na literatura (BATISTA et al., 2010; NEVILLE et al., 2016).

Ao analisar as características clínicas dos casos incluídos nesta pesquisa, observou-se que a maioria dos pacientes era do sexo masculino, com 60 anos ou mais e histórico de alcoolismo e tabagismo, corroborando os dados relatados por Antunes et al. (2007), que afirmaram que o carcinoma de células escamosas representa 90 a 95% dos casos de câncer de língua, acomete preferencialmente indivíduos do sexo masculino, na faixa etária situada entre a 6ª e 8ª décadas de vida e está relacionado principalmente ao consumo de fumo e álcool.

O consumo de tabaco, nas suas mais diversas formas, tem sido mencionado como fator de risco para o câncer oral, porém o tabaco na forma de fumo é o mais consumido e o principal fator associado ao CCEO (JOHNSON, 2001). Segundo Petti (2009), cerca de 75% dos casos de câncer oral são atribuídos ao uso do tabaco (fumado e/ou mascado). O tabaco contém mais de 50 carcinógenos em potencial tais como nitrosaminas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (GRUPTA; MURTI; BHONSLE, 1996). Alguns deles podem causar alteração no gene supressor de tumor p53 ou em outros genes que regulam o ciclo celular, ou modulam o sistema imune (BRENNAN et al., 1995).

A relação entre câncer oral e uso do álcool é independente do tipo de bebida alcoólica e está associado com a quantidade de etanol ingerido e com o tempo de seu consumo (MC DOWELL, 2006). O álcool favorece a absorção dos carcinógenos do tabaco pelas células do epitélio oral por possuir ação solvente e promover um aumento da susceptibilidade do indivíduo ao câncer, pois leva à imunossupressão e à deficiência nutricional (DOBRÓSSY, 2005). O álcool não é um carcinógeno direto, pois precisa ser metabolizado em várias formas de aldeídos que têm propriedades carcinogênicas (WOGAN et al., 2004; SCULLY; BAGAN, 2009). Estudos mostram que a oxidação do etanol pode ser realizada pela flora bucal, produzindo acetaldeído, substância considerada como pró-tumoral (HOMANN et al., 2000; KURKIVUORIRT, 2006).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer oral é o uso conjunto do fumo e do álcool (SILVA et al., 2011). Quando o hábito de fumar está associado ao etilismo, há efeitos sinérgicos na carcinogênese do tabaco. Além disso, aproximadamente 80% dos pacientes dependentes de álcool relatam fumar cigarros (KOHN; TSOH, WEISNER, 2003). Estudo realizado por Znaor et al. (2003) constatou que o consumo de álcool juntamente com o hábito de fumar aumentava em quase 5 vezes a chance de o indivíduo adquirir câncer oral.

Nesse trabalho verificou-se que mais da metade dos casos era de tumor em estágio avançado (n = 30; 52,6%), com gradação histopatológica avaliada em risco intermediário (n = 33; 56,9%), submetidos a tratamento cirúrgico associado a outras modalidades (n = 43; 74,1%). Um total de 19 pessoas (32,8%) apresentaram recidiva local em até 2 anos. Apenas 26 casos apresentaram dados sobre etapa do diagnóstico do comprometimento linfonodal, sendo que destes, a grande maioria, 24 casos (41,4%) estavam com comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico e apenas 2 (3,4%) durante o tratamento. Sobre o desfecho, 21 pessoas vieram à óbito (36,2%). Esses resultados são amparados pelos relatos da literatura vigente, como os que segem abaixo.

O CCEO caracteriza-se por apresentar frequente invasão perineural, recidivas precoces, altas taxas de invasão local e metástase, possuindo, portanto, grande agressividade. Muitos pacientes morrem em decorrência da disseminação local ou regional da doença (OGBUREKE et al., 2007; SILVA et al., 2011). Por tais motivos se faz necessário realizar o diagnóstico precoce dessa doença, visto que sua detecção em estágios iniciais reduz a mortalidade, morbidade e diminui a extensão da cirurgia necessária ao tratamento, que leva frequentemente à perda da função, mutilação, depressão e pobre qualidade de vida (MEHROTA; GUPTA, 2011). O fato de a maioria dos casos ser de estágio avançado pode ser explicado porque em estágio iniciais o CCEO é indolor, fazendo com que haja demora pela procura por diagnóstico e tratamento. Quando apresenta sintomas e ocorre o diagnóstico, já se encontra em estágios avançados (AL-JABER; AL-NASSER; EL-METWALLY, 2016).

Segundo Lim (2006), Sano; Myers (2007) e Rusthoven et al. (2008) o carcinoma de células escamosas de língua oral é o tipo de câncer da cavidade oral mais relacionado com metástases para linfonodos e mais susceptível à invasão local e metástases à distância. Dessa forma, pacientes com CCELO tem prognóstico significativamente pior quando comparado com lesões similares de orofaringe,

laringe e aquelas situadas em outras localizações da cavidade oral. Para Antunes et al. (2007) não somente o sítio anatômico mas também o tipo histológico e o estágio clínico são fatores prognósticos para a doença. Analisando esses relatos conseguimos associar os resultados do presente estudo onde, os casos de CCELO, são, em sua maioria, de estágio clínico avançado, com grau histopatológico intermediário, com frequente envolvimento linfonodal, recidiva local e metástase.

No estudo de Costa et al. (2002), eles investigaram a existência da correlação entre o estadiamento clínico TNM, localização anatômica e o prognóstico do CCEOs. Foi evidenciado que pacientes com lesões localizadas em lábio inferior encontravam-se predominantemente em estágio I e aquelas com lesões em língua apresentavam-se em estágio III e IV. Estes resultados sugerem que os CEOs em língua, palato mole e assoalho bucal tendem a ser mais agressivos e infiltrativos do que os tumores localizados em lábio, possuindo assim, pior prognóstico.

A base do tratamento para o CCEO é a excisão cirúrgica. A cirurgia e a radioterapia adjuvantes combinados, incluindo o tumor primário e os linfonodos regionais, são comumente utilizadas nos estágios mais avançados (III e IV). Esta técnica está sendo cada vez mais utilizada em pequenos tumores, estágio II, que apresentam indicadores patológicos de metástase linfonodal e invasão perineural. Para tumores no estágio I a excisão cirúrgica é eficaz e preserva bastante a função do paciente (NEVILLE ET AL., 2016).

Sabe-se que o CCEO apresenta fatores de acometimento multifatoriais. Fatores extrínsecos como fumo e álcool podem gerar alterações genéticas cumulativas e isso reflete a suscetibilidade e a tendência do genoma para adquirir múltiplas alterações, o que conduz ao desequilíbrio no ciclo celular, incluindo divisão, diferenciação e apoptose. (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; NEVILLE et al., 2016).

Quando o organismo é exposto a agentes mutagênicos, proteínas responsáveis pelo reparo do DNA são produzidas para remoção do dano genético. A via de reparo BER, incluindo os genes *APE1*, *XRCC1* e suas proteínas correspondentes participam desse processo de reparo de danos ao DNA, através da remoção de pares de bases danificadas (SOUZA et al., 2011)

Os resultados do presente estudo com relação à imunoexpressão dessas proteínas ressaltaram que a maioria dos casos apresentaram alta imunoexpressão para *APE1* (N = 36; 62,1%), sugerindo papel desta na carcinogênese dos CCE de



língua oral. Corroborando, Hsia et al. (2016) detectaram elevada imunoe expressão de APE1 em 52,73% dos 146 CCEOs e de cabeça e pescoço avaliados. Mahjabeen et al. (2014) também encontraram elevada imunoe expressão de APE1 em 50 casos de CCEOs e de cabeça e pescoço. Outro estudo detectou imunoe expressão nuclear de APE1 em 92,3% dos 65 casos de carcinoma esofágico estudados (NAGOYA et al., 2014).

Apesar da elevada imunoe expressão, os resultados da comparação com XRCC1, p53 e Ki67 não mostraram associação estatisticamente significativa, assim como para os parâmetros clínicos prognósticos e gradação histológica de malignidade dos casos de CCELO (p-valores > 0,05).

A necessidade de APE1 para a sobrevivência celular e sua frequente imunoe expressão elevada em células tumorais sugerem fortemente um papel desta proteína na prevenção da morte celular e no controle da proliferação celular. No entanto, APE1 tem habilidade para ativar fatores de transcrição, tais como p53 e Egr-1, envolvidos principalmente no controle do ciclo celular (TELL et al., 2009; THAKUR et al., 2014). Apesar de a literatura sugerir associação de APE1 com fatores de transcrição como o p53 e controle do ciclo celular, essa ligação não foi observada na presente pesquisa.

A desregulação de APE1 não é uma característica consistente em todos os tumores e seu papel na tumorigênese está atualmente em debate. Sugere-se que a inibição da função redox de APE1 poderia dificultar a proliferação celular em câncer de próstata, reduzindo a atividade de ligação de NF-κB. Em contraste, a inibição da expressão de proteínas APE1 e VEGF diminuiu a proliferação celular e angiogênese em osteossarcoma. Da mesma forma, foi proposto que a alta expressão de APE1 aumentou a tumorigênese do câncer gástrico. Mas a relação entre APE1 e vários tipos de câncer ainda não é clara (QING et al., 2015).

Associando os resultados dessa pesquisa sobre o APE1 com os descritos por Tell et al. (2009); Qing et al. (2015); Wei et al. (2016), pode-se inferir que para os casos de CCE de língua oral, analisados nesse estudo, sua função possa ser de reparo e não relacionado à associação com o fator de transcrição p53 e com o Ki67, portanto, com o processo de proliferação celular. Porém, especula-se que APE1 possa também ter associação com outros fatores de transcrição importantes como proteína de resposta ao crescimento precoce 1 (Egr-1), fator nuclear κB (NF-κB), fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1), proteína de ligação ao elemento de resposta

cAMP (CBER), proteína ativadora 1 (AP-1) e Pax, fatores esses que não foram analisados na presente pesquisa, não podendo descartar sua função no processo de controle do ciclo celular.

A APE1 desempenha seu papel em vários contextos. É uma proteína com função dupla, envolvida tanto nas vias de reparo de excisão de base no DNA (BER) quanto na regulação transcricional eucariótica da expressão gênica. Este efeito é obtido como co-ativador redox de fatores de transcrição, como a proteína Egr-1, fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), p53, fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1), proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CBER), proteína ativadora 1 (AP-1) e Pax em diferentes sistemas celulares. Essas duas atividades biológicas estão localizadas em dois domínios distintos. O N-terminal, contendo a localização nuclear, é dedicada principalmente para a atividade redox, através de Cys65, enquanto o C-terminal exerce a atividade enzimática nos sítios abásicos de DNA (TELL et al., 2009; QING et al., 2015; WEI et al., 2016).

Embora a parte C-terminal da proteína seja altamente conservada durante a filogenia, o N-terminal não é. As duas principais funções do APE1, redox e reparo, são completamente independentes em suas ações. Embora o local de reparo do DNA por APE1 tenha sido claramente delineado, o domínio redox não é totalmente esclarecido. O único resíduo de Cys requerido para a função redox completa é C65, que está enterrado dentro da proteína. Sendo assim, o papel vital do APE1 parece ser devido à sua via de reparo (TELL et al., 2009), corroborando os achados desta pesquisa.

Quando se testou associação da imunoexpressão da APE1 e a classificação dos casos segundo o sistema de gradação histopatológica proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005), não se observou associação estatística significativa. Esses achados assemelham-se aos encontrados por Hsia et al. (2015) e Souza et al. (2011), que também não observaram associação entre a expressão da APE1 e casos de CCEO e CCE de lábio definidos pela OMS (2005) como bem, moderadamente ou pobremente diferenciados, respectivamente. Por sua vez, no estudo de Mahjabeen et al. (2014), os casos de CCE de cabeça e pescoço estudados demonstraram maior expressão da APE1 em casos pobremente diferenciados ( $p < 0,05$ ). Essas diferenças podem se dar por conta dos diversos fatores etiológicos que estão envolvidos na patogênese de tumores em sítios anatômicos diferentes, o que pode influenciar na evolução e prognóstico.

O valor prognóstico de APE1 foi avaliado em outros tipos de câncer. Woo et al. (2014) observaram elevada imunoexpressão nuclear dessa proteína em casos de câncer de mama, mostrando uma tendência à associação com pior prognóstico, em relação à sobrevida livre de doença. Entretanto, esses autores também não observaram associação com outros fatores prognósticos. Já Qing et al. (2015) observaram que para casos de câncer do trato gastrointestinal a elevada expressão de APE1 esteve significativamente associada com profundidade de invasão, metástase linfonodal, subtipo histopatológico, sobrevida global e tamanho do tumor.

É inegável que a superexpressão da APE1 em neoplasias malignas foi ressaltada neste estudo e nos citados previamente. Segundo Hsia et al. (2015) e Mahjabeen et al. (2014), a alta expressão desta proteína pode estar realmente envolvida com a progressão tumoral ou pode conferir resistência terapêutica às células tumorais e, por isso, influenciar negativamente o prognóstico dos pacientes com câncer. O fato de não observarmos associação estatística entre sua expressão e os parâmetros clínicos pode estar relacionado a características intrínsecas da amostra, como o tamanho amostral ou a maioria dos casos já se encontrarem em estágios III e IV. O resultado para os parâmetros histopatológicos desse e outros estudos mostram que esta proteína provavelmente não está relacionada a um pior grau histopatológico de malignidade, entretanto, diferenças metodológicas nos sistemas de gradação utilizados prejudicam essa comparação. Enquanto o sistema proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005) faz uma análise do risco histopatológico, o sistema mais utilizado por outros estudos (OMS, 2005) determina apenas o grau de diferenciação do tumor, sendo uma análise mais subjetiva.

Quando avaliada a imunoexpressão da proteína XRCC1, esta mostrou-se elevada (n = 38; 65,5%) na maioria dos casos, sugerindo papel desta na carcinogênese dos CCE de língua oral. Resultados semelhantes foram encontrados por Ang et al. (2011) para 138 casos de CCECP (incluindo 57 CCEOs), dos quais 55,8% apresentaram alta imunoexpressão de XRCC1. Nix et al. (2004) observaram elevada expressão nuclear de XRCC1 em 63% dos casos resistentes ao tratamento radioterápico, enquanto apenas 43% dos casos radiosensíveis apresentaram elevada expressão da proteína, em estudo com pacientes portadores de CCE de laringe. Entretanto, o estudo de Mahjabeen et al. (2014) demonstrou expressão tanto nuclear quanto citoplasmática da XRCC1 em 50 casos de CCECP (incluindo 14 casos de CCEOs); os autores observaram baixa expressão da proteína na maioria dos

casos. Resultados variados na expressão da XRCC1 também foram demonstrados em câncer gástrico e de bexiga por Sakano et al. (2013) e Wang et al. (2010). Portanto, assim como para a APE1, estes resultados podem ter sido influenciados pelo clone do anticorpo utilizado, como também pelas características da amostra, incluindo tumores de origens diferentes.

Os resultados da comparação dos níveis de imunexpressão das proteínas XRCC1 com APE1, p53 e Ki67 não mostraram associação estatisticamente significativa entre si em casos de carcinoma de células escamosas de língua oral (p-valores > 0,05).

A proteína XRCC1 pertence ao grupo das proteínas reguladoras, que são essenciais em diversas vias de sinalização, não apresentando atividade enzimática (LOIZOU et al., 2004). Sabe-se que tal proteína regula a transdução de sinais e ajuda a localizar componentes da via de sinalização, organizando-os em complexos. Atua no suporte a outros fatores de reparo, interagindo com a maioria dos componentes da via BER, coordenando principalmente a função de enzimas que dão início à via, como MPG, OGG1 e NEIL2. A XRCC1 também interage com diversas outras proteínas envolvidas no reparo do DNA pela via BER, incluindo DNA ligase IIIa, DNA polimerase beta, APE1, kinase/fofatase polinucleotídea e polimerases poli(ADP-ribose) 1 e 2 (PARP-1 and 2) (BREM; HALL, 2005; ALMEIDA; SOBOL, 2007).

Apesar de a literatura demonstrar que XRCC1 interage com APE1, ajudando a localizar componentes da via de sinalização, e neste estudo as duas proteínas mostraram-se com imunexpressão elevada, quando associadas, não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Resultado semelhante foi observado por Sakano et al. (2013) em carcinoma de bexiga, onde os autores também não observaram associação estatística significativa entre a expressão de XRCC1 e APE1. Entretanto, foi observado uma correlação inversa entre a imunexpressão de XRCC1 e APE1 por MAHJABEEN et al. (2014) em CCEO de cabeça e pescoço, carcinomas de pulmão, de estômago e também em meduloblastoma.

Foi realizada a associação entre a expressão desta proteína e os parâmetros clínicos e histopatológicos. Somente foi observada associação estatisticamente significativa entre a imunexpressão da XRCC1 e o estágio clínico (p = 0,005). A imunexpressão de XRCC1 foi significativamente maior nos casos de lesão em estágio inicial (I e II) (n = 23; 62,2%) e menor nos casos com estágios avançados (III

e IV) ( $n = 16$ , 80%) ( $p=0,05$ ). Mahjabeen et al. (2014) também demonstraram alta expressão de XRCC1 nos casos com estágio I e II ( $p<0,001$ ). Ang et al. (2011) não encontraram associação entre esses parâmetros, mas demonstraram que a alta expressão de XRCC1 esteve relacionada a uma menor sobrevida.

Existem resultados conflitantes sobre o significado da alta expressão de XRCC1 em diferentes tipos de neoplasias e com diferentes desfechos. O estudo de Abdel-Fatah et al. (2013) identificou que a superexpressão de XRCC1 está associada a piores desfechos em carcinoma de ovário. Ao contrário, estudos realizados em carcinoma de bexiga (SAKANO et al., 2013), de esôfago (WEI et al., 2015) e de colo uterino (BAJPAI et al., 2013) demonstraram que a superexpressão de XRCC1 está relacionada a melhores parâmetros clínicos, morfológicos e de seguimento destas neoplasias. Assim, nesta pesquisa, levando em consideração a alta imunoexpressão em estágios iniciais e menor imunoexpressão em estágios avançados pode-se sugerir que talvez essa exerça seu papel normal de proteção, porém novos estudos tornam-se necessários para confirmar tal suposição já que não se encontrou associação estatística com outros parâmetros clínicos como recidiva e desfecho, assim como os autores citados acima (ANG et al., 2011; MAHJABEEN et al., 2014). Também não foram encontradas associações significativas para os parâmetros histopatológicos, diferindo do encontrado por Mahjabeen et al. (2014), que observaram associação entre a subexpressão de XRCC1 e casos pobremente diferenciados de CCE de cabeça e pescoço.

É importante ressaltar que, em alguns tipos de câncer, segundo relato de Ang et al. (2011), as proteínas XRCC1 e APE1 permitem e facilitam o processo de reparo do DNA e são, portanto, especialmente importantes em pacientes sob tratamento quimio e radioterápico. A radiação ativa o processo de morte celular ao induzir danos ao DNA, como danos às bases nitrogenadas, quebra de fita simples, quebra de fita dupla e recombinações entre as fitas de DNA. Por sua vez, a quimioterapia, particularmente a baseada no uso da platina, provoca ligação do fármaco ao DNA, formando adutos que distorcem a estrutura do mesmo, causando danos e morte celular. A combinação da quimioterapia com a radiação aumenta o efeito citotóxico geral da radioterapia ao induzir mais danos ao DNA e prejudicar o seu reparo. Esse reparo é, até certo ponto, processado pelos complexos enzimáticos da via BER. Portanto, uma alta expressão de suas principais proteínas pode aumentar a

capacidade das células tumorais de reparar o seu DNA, provocando resistência ao tratamento em alguns tipos de câncer.

Não se verificou, nesse estudo, associação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão das proteínas de reparo APE1 e XRCC1 com as proteínas relacionadas com o ciclo celular p53 e Ki67 em carcinoma de células escamosas de língua oral (p-valores > 0,05). Associação estatisticamente significativa foi observada entre o estadiamento clínico do tumor e a imunoexpressão de p53 (p = 0,047). A imunoexpressão de p53 foi significativamente maior nos casos de lesão em estágio avançado III e IV (n = 19; 65,5%) e menor nos casos com estágios iniciais I e II (n=17, 60,7%).

O valor prognóstico da p53 em câncer oral é incerto e alguns estudos não encontraram qualquer impacto na sobrevida dos pacientes. Ao contrário dos resultados dessa pesquisa, Tsantoulis et al. (2007) afirmaram que sua expressão influencia no prognóstico de pacientes com baixo estadiamento clínico, sem linfonodos positivos, ou naqueles portadores de mutações *TP53* específicas.

A imunoistoquímica não define a existência de mutações genéticas, mas existem dados que sugerem a relação entre o prolongamento da estabilidade da proteína p53 e, conseqüentemente, a sua expressão imunoistoquímica, com mutações ocorrendo, principalmente as mutações oncogênicas. É possível que o acúmulo da proteína p53 em células tumorais possa, em alguns casos, indicar a existência de um defeito regulatório na sequência codificadora protéica no gene, ao invés de uma mutação. Observaram-se discrepâncias entre a expressão da proteína p53 e a presença de mutações e, além disso, pode ocorrer a mutação no gene *TP53*, sem aumento na expressão da proteína (LORAND-METZE, 2004). Sendo assim, não podemos inferir, nesse trabalho imunoistoquímico, que o acúmulo da p53 em estágios avançados do CCE de língua oral seja devido a mutações, sendo necessário realização de outras pesquisas associando outras técnicas.

O cruzamento entre imunoexpressão de Ki67 e p53 (p-valor = 0,066) foi marginalmente significativo. Entre os casos em que se observou imunoexpressão de Ki 67 elevada, a imunoexpressão de p53 também foi elevada (n = 18; 62,1%). Não houve significância estatística quando associado a imunoexpressão de Ki67 e p53 com padrões clínicos prognósticos e com a gradação histopatológica (p>0,05)

Apesar de os resultados da associação entre p53 e Ki67 não terem sido estatisticamente significativos, notou-se que há uma tendência positiva entre essas

duas proteínas, que é o que normalmente se encontra na literatura, como o relato de Motta et al. (2009), diferindo que neste foi achado também associação com parâmetros clínicos prognósticos. Neste estudo, eles correlacionaram a expressão imunoistoquímica de p53 e Ki67 nos carcinomas de células escamosas oral e de língua (28 casos) com o estado linfonodal, sexo, grau histológico, volume tumoral e estadiamento clínico. A p53 analisada individualmente mostrou significância estatística quando comparado com o volume tumoral. Apesar de uma forte tendência, a relação de p53 com estado linfonodal não foi significativa. Quando p53 + Ki67 foi analisado e associado com o volume tumoral, foi observada significância.

A literatura mostra que a expressão dos marcadores p53 e Ki67 está relacionada com presença de metástases para linfonodos e pior prognóstico. Nos carcinomas de células escamosas de cavidade oral as proteínas p53 e o Ki67 estão relacionadas entre si e com tumores de maior tamanho, metástase positiva para linfonodos e possivelmente com pior prognóstico. Talvez, o resultado marginalmente positivo observado na presente pesquisa seja devido às características da amostra.

Por fim, não se verificou associação estatisticamente significativa entre a presença de metástase linfonodal nos carcinomas de células escamosas de língua oral e a gradação histológica de malignidade dos tumores ( $p = 0,215$ ).

Algumas limitações para a realização dessa pesquisa merecem ser ressaltadas, pois podem ajudar a elucidar alguns resultados encontrados, como auxiliar a realização de novos estudos sobre o assunto abordado. Tratou-se de um estudo retrospectivo e, por isso, diferentes fatores como a coleta de blocos de material parafinado suficientes para o estudo imunoistoquímico e de informações clínicas bem documentadas, que mostrassem um acompanhamento de no mínimo cinco anos dos pacientes vivos, influenciou diretamente no tamanho amostral que pode não ter sido o suficiente para gerar significância estatística em alguns cruzamentos. Apesar dessas restrições, o fato de se trabalhar com um único sítio anatômico, foi possível traçar um perfil fidedigno da amostra e avaliar o desfecho da doença.

Para finalizar, os resultados aqui apresentados mostraram que a alta imunoexpressão das proteínas APE1, XRCC1, p53 e Ki67 não estão associadas de forma significativa entre si, como também não houve associação com aos parâmetros clínicos e histopatológicos nos casos de câncer de língua oral estudados; não podendo, portanto, serem utilizadas como marcadores prognósticos

independentes. Sabe-se também que a desregulação no controle do ciclo celular influencia na iniciação do processo carcinogênico, porém essa inferência não pode ser fornecida com os resultados aqui apresentados sobre as proteínas analisadas.

Apesar disso, acredita-se que a desregulação dessas e outras proteínas envolvidas na via BER participem na iniciação e progressão do câncer. Outros estudos tornam-se relevantes, principalmente envolvendo diferentes técnicas, para explorar na sua totalidade os mecanismos moleculares que contribuem para a desregulação desses genes e suas proteínas e ajudar a esclarecer o seu papel no câncer oral e em seus diferentes sítios de acometimento.



---

---

*Conclusão*

---

---

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa, pode-se concluir que:

1. A alta imunoexpressão da XRCC1 mostrou-se significativamente associada a um melhor estadiamento clínico e a p53 com pior estadiamento clínico em carcinoma de células escamosas de língua oral. Apesar disto, a imunoexpressão das proteínas XRCC1, APE1, p53 e Ki67 não apresentaram associação significativa entre si e com os demais parâmetros clínicos: metástase, recidiva e desfecho ou com parâmetros de gradação histopatológica.
2. Não houve associação significativa entre as proteínas de reparo do DNA (XRCC1 e APE1) e as proteínas relacionadas com o ciclo celular (p53 e Ki67).
3. A alta imunoexpressão das proteínas APE1 e XRCC1 observada em carcinoma de células escamosas de língua oral sugere sua importância no desenvolvimento e progressão desta doença; no entanto, os resultados desta pesquisa indicam que a expressão imunoistoquímica dessas proteínas não está associada aos parâmetros prognósticos estudados nesta neoplasia.

---

## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATAH, T. et al. Clinicopathological and functional significance of XRCC1 expression in ovarian cancer. **Int. J. cancer.**, v. 132, n. 12, p. 2778–2786, 2013.
- AL-ATTAR, A.; GOSSAGE, L.; FAREED, K. R. Human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreatico-biliary cancers. **Br. J. Cancer**, v. 102, n. 4, p. 704-709, 2010.
- AL-JABER, A.; AL-NASSER, L.; EL-METWALLY, A. Epidemiology of oral cancer in Arab countries. **Saudi Med. J.**, v. 37, n. 3, p. 249-255, 2016.
- ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 6, p. 695-711, 2007.
- ALVES, A. V. F. et al. Expressão Ki67 e p16<sup>INK4a</sup> em carcinomas espinocelulares periorais quimicamente induzidos em camundongos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 43, n. 2, p. 72-79, 2016.
- ANG, M. K. et al. High XRCC1 protein expression is associated with poorer survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 17, n. 20, p. 6542–52, 2011.
- ANGIERO, F. et al. Expression of p16, p53 and Ki67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. **Anticancer Res.**, v. 28, n. 5A, p. 2535-2540, 2008.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Malignancy grading of squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 94, n. 4, p. 347-355, 1986.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, n. 3, p. 222-249, 1987.
- ANNEAROTH, G.; HANSEN, L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 92, n. 5, p. 448-468, 1984.
- ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S.; SILVERMAN, S. Jr. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **J. Oral Pathol.**, v. 15, n. 3, p. 162-168, 1986.
- ANTUNES, A. A. et al. Câncer da língua: estudo retrospectivo de vinte anos. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v. 36, n. 3, p. 152-154, 2007.

ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E. Marcadores biológicos: PCNA and Ki67. Breve revisão. **Rev. Fac. Odontol. São José Campos**, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1999.

ARTANDI, S. E. et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. **Nat.**, v. 406, n. 6796, p. 641-645, 2000.

BARBOSA, T. V. et al. Valor prognóstico do Ki67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 69, n. 5, p. 629-634, 2003.

BARNES, L. et al. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. (Série World Health Organization Classification of Tumours)

BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n. 3, p. e74-79, 2010.

BEERNINK, P. T. et al. Specificity of protein interactions mediated by BRCT domains of the XRCC1 DNA repair protein. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 34, p. 30206-30213, 2005.

BIRAJDAR, S. S. et al. Expression of Ki67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v. 18, n. 2, p. 169-176, 2014.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 167-178, 2005.

BREM, R.; HALL, J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 8, p. 2512-2520, 2005.

BRENNAN, J. A.; BOYLE, J. O.; KOCH, W. M., et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med**, v. 332, p. 712-7, 1995.

BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the lip. A study of 537 cases. **JAMA**, v. 74, n. 10, p. 656-664, 1920.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 18, n. 8, p. 432-437, 1989.

CALDECOTT, K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 2, n. 9, p. 955-969, 2003.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nat. Educ.**, v. 1, n. 1, p. 103, 2008.

COOPER, G. M.; HAUSMAN; R. E. **The cell: a molecular approach**. 6. ed. Massachusetts: Boston University, 2000.

COSTA, A. L. L. et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 16, n. 3, p. 216-20, 2002.

CUARADO, M. P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 21, n. 3, p. 194-200, 2009.

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagen.**, v. 19, n. 3, p. 169-185, 2004.

DIANOVA, I. I. et al. XRCC1-DNA polymerase  $\beta$  interaction is required for efficient base excision repair. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. 8, p. 2550-2555, 2004.

DIVINE, K. K. E. et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. **Mutat. Res.**, v. 461, n. 4, p. 273-278, 2001.

DÖBRÓSSY, L. Epidemiology of head and neck câncer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**, v. 2, n. 1, p. 9-17, 2005.

DURR, M. L.; LI, D.; WANG, S. J. Oral cavity squamous cell carcinoma in never smokers: analysis of clinicopathologic characteristics and survival. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 34, n. 5, p. 388-393, 2013.

ERSTER, S. et al. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 15, p. 6728-6741, 2004.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. **Oncologia molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 770p.

GAETTI-JARDIM, E. C. et al. Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. **Rev. Odontol.**, v. 31, n. 2, p. 09-13, 2010.

GIOVANNACCI, I. et al. Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: a systematic review. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 21, n. 3, p. e305-315, 2016.

GUPTA, P. C.; MURTI, P. R.; BHONSLE, R. B. Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. **Crit Rev Toxicol**, v. 26, p. 183-98, 1996.

HAMEL, N. et al. No association between p53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Br. J. Cancer**, v. 82, n. 4, p. 757-759, 2000.

HSU, S.M.; RAINER, L.; FANGER, H.A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.75, p.734-738, 1981.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nat.**, v. 411, n. 6835, p. 366-374, 2001.

HOMANN, N.; TILONEN, J.; MEURMAN, J. R.; RINTAMÄKI, H.; LINDQVIST, C.; RAUTIO, M., et al. Increase salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 663-8, 2000.

HSIA, K.-T. et al. The impact of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) on treatment response and survival in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 38, n. 4, p. 550-559, 2016.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between abc and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HU, Z. et al. DNA repair gene XPD polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. **Lung Cancer**, v. 46, n. 1, p. 1-10, 2004.

INCA. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INWALD, E. C. et al. Ki67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 139, n. 2, p. 539-552, 2013.

JIN, X. et al. Higher lung cancer risk for African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype. **Carcinog.**, v. 16, n. 9, p. 2205-2208, 1995.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. H. K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontol.** 2000, v. 57, n. 1, p. 19-37, 2011.

JUREL, S. K. et al. Genes and oral cancer. **Indian. J. Hum. Genet.**, v. 20, n. 1, p. 4-9, 2014.

KADEMANI, D. et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 11, p. 1599-1605, 2005.

KAWAJIRI, K. et al. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. **Carcinog.**, v. 14, n. 6, p. 1085-1089, 1993.

KONDO, Y. et al. Clinicopathological significance of carbonic anhydrase 9, glucose transporter-1, Ki67 and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oncol. Rep.**, v. 25, n. 5, p. 1227-1233, 2011.

KUMAR, P.; KANE, S.; RATHOD, G. P. Coexpression of p53 and Ki 67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India. 2012. **Braz. Oral Res.**, v. 26, n. 3, p. 228-234, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KURKIVOURI, J.; SALASPURO, V.; KAIHOVAARA, P.; KARI, K.; RAUTEMAA, R.; GRÖNROOS, L. et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. **Oral Oncol**, v. 43, n. 2, p. 181-6, 2006.

KOHN, C. S.; TSOH, J. Y.; WEISNER, C. M. Changes in smoking status among substance abusers: baseline characteristics and abstinence from alcohol and drugs at 12-month follow-up. **Drug Alcohol Depend.**, v. 69, n. 1, p. 61-71, 2003.

KROKAN, H. E. et al. Base excision repair of DNA in mammalian cells. **FEBS letters**, v. 476, n. 1-2, p. 73-77, 2000.

LADIGES, W. C. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 11, p. 1612-1619, 2006.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística Aplicada**. 6. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2016.

LIM, M. S. RE: correlational of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, by Kim S-H, Cho NH, Kim K, et al. **J. Surg. Oncol.**, v. 93, n. 4, p. 253-254, 2006.

LINDENBLATT, R. D. C. R. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems analysis of the best survival predictor. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 1, p. 34-39, 2012.

LOIZOU, J. I. et al. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. **Cell**, v. 117, n. 1, p. 17-28, 2004.

LORAND-METZE, I. et al. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. **Leuk. Res.**, v. 28, n. 6, p. 587-594, 2004.

LOURENÇO, S. Q. C. et al. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.

LUND, C. et al. Epidermoid carcinoma of lip. Histologic grading in clinical evaluation. **Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.**, v. 14, n. 5, p. 465-474, 1975.

MAHALE, A.; SARANATH. D. Microsatellite alterations on chromosome 9 in chewing-tobacco induced oral squamous cell carcinomas from India. **Oral Oncol.**, v. 36, n. 2, p. 199-206, 2000.

MAHJABEEN, I. et al. Deregulation of base excision repair gene expression and enhanced proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. **Tumour Biol.**, v. 35, n. 6, p. 5971-5983, 2014.



MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MARINUS, M. G. DNA mismatch repair. **EcoSal Plus**, v. 5, n. 1, 2012.

MARTEIJN, J. A. et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 7, p. 465-481, 2014.

MASSON, M. et al. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, n. 6, p. 3563-3571, 1998.

MCDOWELL, J. D. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 39, n. 2, p. 277-294, 2006.

MCLEOD, N. M. H.; SAEED, N. R.; ALI, E. A. Oral cancer: delays in referral and diagnosis persist. **Br. Dent. J.**, v. 198, n. 11, p. 681-684, 2005.

MEHROTRA, R.; GUPTA, D. K. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. **Head Neck Oncol.**, v. 3, p. 33, 2011.

MENENDEZ, D. et al. Changing the p53 master regulatory network: Elementary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2191-2201, 2007.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. **Semin. Cancer Biol.**, v. 13, n. 1, p. 49-58, 2003.

MOTTA, R. R. et al. Ki67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 4, p. 544-549, 2009.

MURATA, M. et al. Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. **Carcinog.**, v. 17, n. 2, p. 261-264, 1996.

NAG, S. et al. The MDM2-p53 pathway revisited. **J. Biomed. Res.**, v. 27, n. 4, p. 254-271, 2013.

NAGOYA, H. et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease-1 is associated with angiogenesis and VEGF production via upregulation of COX-2 expression in esophageal cancer tissues. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 306, n. 3, p. G183-190, 2014.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2016.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J. Clin.**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

OGBUREKE, K. U. E. et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 9, p. 920-932, 2007.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death Differ.**, v. 10, n. 4, p. 431-442, 2003.

PATEL, S.C. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, p. 1488-94, 2011.

PAMPALONA, J. et al. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **PLoS Genet.**, v. 8, n. 4, p. e1002679, 2012.

PASKULIN, D. et al. The TP53 fertility network. **Genet. Mol. Biol.**, v. 35, n. 4, p. 939-946, 2012. Suplemento

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n.4-5, p. 340-50, 2009.

PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum. Mutat.**, v. 28, n. 6, p. 622-629, 2007.

QING, Y. et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 9, p. 901-909, 2015.

RAYBAUD-DIOGÈNE, H et al. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, v. 32B, n. 3, p. 143-149, 1996.

REMMERBACH, T. W. et al. Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping. **Cancer Res.**, v. 69, n. 5, p. 1728-1732, 2009.

ROBERTSON, A. B. et al. Base excision repair: The long and short of it. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 981–993, 2009.

RUSTHOVEN, K. et al. Poor prognosis in patients with stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 112, n. 2, p. 345-351, 2008.

SAKANO, S. et al. ERCC1 and XRCC1 expression predicts survival in bladder cancer patients receiving combined trimodality therapy. **Mol. Clin. Oncol.**, v. 1, n. 3, p. 403-410, 2013.

SANO, D.; MYERS, J. N. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 26, n. 3-4, p. 645-662, 2007.

SARANATH, D. et al. p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leucoplakias from India. **Oral Oncol.**, v. 35, n. 3, p. 242-256, 1999.

SARANATH, D.; TANDLE, A. T.; DEO, M. G. Loss of p53 gene as a biomarker of high risk oral leukoplakias. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 34, n. 3, p. 266-273, 1997.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer: a review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 32, n. 3, p. 233-245, 2003.

SHAHBAZI, J.; LOCK, R.; LIU, T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhanced p53 function and represses tumorigenesis. **Front. Genet.**, v. 13, n. 4, p. 80, 2013.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012.

SILVA, C. C.; AMARAL, B.; FRIAS-BULHOSA, J. Carcinoma espinocelular da língua: fatores de risco e importância do reconhecimento de lesões pré-malignas. **Rev. Port. Estomatol. Med. Dent. Cirur. Maxilofac.**, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2010.

SILVA, S. D. et al. Advances and applications of oral cancer basic research. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 9, p. 783-791, 2011.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 6. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis.**, v. 15, p. 388-399, 2009.

SOUZA, L. R. et al. Immunohistochemical analysis of p53, APE1, hMSH2 and ERCC1 proteins in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 58, n. 3, p. 352-360, 2011.

STOREY, A. et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 229-234, 1998.

SWAMINATHAN, U. et al. Expression of p53 and cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa: an immunohistochemical study. **J. Oral maxillofac. Pathol.**, v. 16, n. 2, p. 172-177, 2012.

TANAKA, T.; TANAKA, M.; TANAKA, T. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. **Patholog. Res. Int.**, v. 2011, id. 431246, 2011.

TANDLE, A. T.; SANGHVI, V.; SARANATH, D. Determination of p53 genotypes in oral cancer patients from India. **Br. J. Cancer**, v. 84, n. 6, p. 739-742, 2001.

TANG, Y. et al. Acetylation is indispensable for p53 activation. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 612-626, 2008.

TELL, G. et al. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 11, n. 3, p. 601-619, 2009.

TELL, G.; DEMPLE, B. Base excision DNA repair and cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 584-585, 2015.

THAKUR, S. et al. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. **Exp. Mol. Med.**, v. 46, p. 1-21, 2014.

THOMASOVA, D. et al. p53-independent roles of MDM2 in NF- $\kappa$ B signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases. **Neoplasia**, v.14, n. 12, p.1097-1101, 2012.

THOMPSON, L. H. et al. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 12, p. 6160-6171, 1990.

THOMPSON, L. H.; WEST, M. G. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. **Mutat. Res.**, v. 459, n. 1, p. 1-18, 2000.

TSANTOULIS, P. K. et al. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 6, p. 523-534, 2007.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

WANG, P. et al. XRCC1 downregulated through promoter hypermethylation is involved in human gastric carcinogenesis. **J. Dig. Dis.**, v. 11, n. 6, p. 343-351, 2010.

WANG, Y. et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. **DNA Repair (Amst)**, v. 2, n. 8, p. 901-908, 2003.

WARNAKULASURIYA, S. Causes of oral cancer: an appraisal of controversies. **Br. Dent. J.**, v. 207, n. 10, p. 471-475, 2009.

WEI, X. et al. Prediction of survival prognosis of non-small cell lung cancer by APE1 through regulation of epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28523-28539, 2016.

WOGAN, G. N. et al. Environmental and chemical carcinogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 14, n. 6, p. 473-486, 2004.

WOLFF, K.; FOLLMAN, M.; NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. **Dtsch. Arztebl. Int.**, v. 109, n. 48, p. 829-835, 2012.

WOO, J. et al. Prognostic value of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) expression in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–7, 2014.

WOOD, R. D. et al. Human DNA repair genes. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1284-1289, 2001.

WOOLGAR, J. A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 42, n. 3, p. 229-239, 2006.

XIE, S. et al. What is the prognostic significance of Ki67 positivity in oral squamous cell carcinoma? **J. Cancer**, v. 7, n. 7, p. 758-767, 2016.

ZNAOR, A. et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. **Int. J. Cancer**, v. 105, n. 5, p. 681-686, 2003.

ZHANG, Y.; XIONG, Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. **Science**, v. 292, n. 5523, p. 1910-1915, 2001.

ZHAO, X. N.; USDIN, K. The Repeat Expansion Diseases: the dark side of DNA repair? (IN PRESS). **DNA Repair**, 2015.

---

*Appendice*

---

## APÊNDICE A

### Ficha para coleta de dados clínicos

Ficha para anotação: Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nº do prontuário: \_\_\_\_\_

Nº na Patologia: \_\_\_\_\_

#### Coleta de informações do prontuário

Nome: \_\_\_\_\_

Gênero: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_

Estadiamento: T \_\_\_\_\_ N \_\_\_\_\_ M \_\_\_\_\_

Data da biópsia excisional: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data do início do tratamento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Tratamento recebido: ( ) {[1-cirurgia; 2-radioterapia; 3-quimioterapia], mais de um tratamento, colocar os nº correspondentes}

Metástase linfonodo: ( ) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Metástase à distância: ( ) Recidiva Local ( ) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data de diagnóstico de Metástase: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Estado da doença:** ( )

Data do último seguimento ( ) ou data do óbito \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Estado da doença:** [1-remissão completa, 2-remissão parcial, 3-doença estável, 4-doença em progressão, 5-óbito por câncer, 6-óbito por não câncer]

**Metástase linfonodo:** [1-sim, 2-não]

**Metástase à distância:** [1-sim, 2-não]

#### Outras informações

Bebe? Sim ( ) Não: ( ) Quantidade dose/dia: \_\_\_\_\_  
Por quanto tempo: \_\_\_\_\_

Fuma?

Sim ( ) Não: ( ) Quantidade cigarro/dia: \_\_\_\_\_  
Por quanto tempo: \_\_\_\_\_

---


*Anexo*

---



## ANEXO

### ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer.

	<b>LIGA NORTE RIOGRANDENSE CONTRA O CÂNCER</b>													
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>														
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>														
<b>Título da Pesquisa:</b> Correlações Clinicopatológicas, imuno-histoquímicas e de resposta ao tratamento quimioterápico e radioterápico com polimorfismo em genes do reparo do DNA em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço														
<b>Pesquisador:</b> ROSEANA DE ALMEIDA FREITAS														
<b>Área Temática:</b>														
<b>Versão:</b> 1														
<b>CAAE:</b> 37422714.1.0000.5293														
<b>Instituição Proponente:</b> Liga Norte Riograndense Contra o Câncer														
<b>Patrocinador Principal:</b> MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO														
<b>DADOS DO PARECER</b>														
<b>Número do Parecer:</b> 838.556														
<b>Data da Relatoria:</b> 20/10/2014														
<b>Apresentação do Projeto:</b>														
<p>O presente trabalho constituirá um estudo coorte longitudinal prognóstico dos polimorfismos nos genes das proteínas de reparo de DNA (XRCC1, APE1, XPD, XPF, XRCC3, RAD51) em uma série de casos de carcinoma de células escamosas oral. Análise Morfológica Esta análise será realizada através de microscopia de luz, em cortes histológicos de 5 m de espessura, corados pela técnica de rotina da hematoxilina e eosina (H.E.), em lâminas confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da UFRN. Serão descritos os aspectos referentes aos padrões de organização das células neoplásicas, assim como suas relações com o estroma tumoral. A partir desta análise, também será definida a gradação histológica de malignidade para cada caso estudado, seguindo-se o sistema recomendado por Brandwein-Gensler et al. (2005) para o front de invasão tumoral Método imuno-histoquímico Toda amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, será submetida a cortes histológicos de 3m de espessura que serão estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3- aminopropyltriethoxisilano, Sigma Chemical CO, USA). Estes cortes histológicos serão corados pelo método da imunoperoxidase através da técnica do polímero de dextrano, utilizando-se os anticorpos anti-XRCC1, -APE1, -XPD, -XPF, -XRCC3 e - RAD51 e a</p>														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="3">Endereço: Rua Dr. Mário Negócio, 2267</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Quintas</td> <td colspan="2">CEP: 59.040-000</td> </tr> <tr> <td>UF: RN</td> <td colspan="2">Município: NATAL</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (84)4009-5494</td> <td>Fax: (84)4009-5480</td> <td>E-mail: biblioteca@liga.org.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Dr. Mário Negócio, 2267			Bairro: Quintas	CEP: 59.040-000		UF: RN	Município: NATAL		Telefone: (84)4009-5494	Fax: (84)4009-5480	E-mail: biblioteca@liga.org.br
Endereço: Rua Dr. Mário Negócio, 2267														
Bairro: Quintas	CEP: 59.040-000													
UF: RN	Município: NATAL													
Telefone: (84)4009-5494	Fax: (84)4009-5480	E-mail: biblioteca@liga.org.br												



**LIGA NORTE RIOGRANDENSE  
CONTRA O CÂNCER**



Continuação do Parecer: 838.556

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não possui pendências e nem lista de inadequações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

OBS: Informamos também que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou e também não aprovou ou expressou sua opinião através de procuração a membros do CEP para análise, aprovação ou não, dos documentos referidos.

NATAL, 20 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**

**Mariana Gurgel do Amaral Furtado  
(Coordenador)**

Endereço: Rua Dr. Mário Negócio, 2267

Bairro: Quintas

CEP: 59.040-000

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)4009-5494

Fax: (84)4009-5480

E-mail: biblioteca@liga.org.br